

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Section de chimie

Département de biochimie

FACULTÉ DES SCIENCES

Prof. J-P. Bargetzi

Glutamate déhydrogénase du cerveau de boeuf

Purification, études de structure et des mécanismes cinétiques

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, 
mention biochimique

par

François ERARD 

de

Le Noirmont (BE)

Thèse No 1848



Juris Druck + Verlag Zürich

1977 

Glutamate déhydrogénase du cerveau de boeuf

Purification, études de structure et des mécanismes cinétiques

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences,
mention biochimique

par

François ERARD

de

Le Noirmont (BE)

Thèse No 1848



La faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs J.-P. BARGETZI, professeur ordinaire et directeur de thèse, D. FEINGOLD, professeur invité (Dpt de Biochimie - Genève) et J. KÄGI, professeur (Université - Zürich), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

GENEVE, le 29 novembre 1977

Le Doyen :

Bernard LEVRAT

Thèse N° 1848



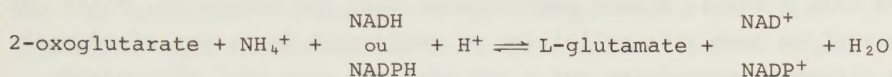
TABLE DES MATIERES

1.	INTRODUCTION	3
2.	PREPARATION DE LA GDH DU CERVEAU	9
2.1	Matériel, méthodes d'analyse	9
2.2	Résultats, discussion	11
3.	PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA PROTEINE	20
3.1	Absorptivité spécifique de l'enzyme natif	21
3.2	Composition en acides aminés	25
3.3	Volume spécifique partiel	29
3.4	Sédimentation à l'équilibre	31
3.5	Analyse de la structure secondaire (CD - ORD)	35
3.6	Relations immunologiques avec l'enzyme homologue du foie	41
4.	PROPRIETES CATALYTIQUES	44
4.1	Spécificité	44
4.2	Paramètres thermodynamiques de la réaction chimique	47
4.3	Paramètres cinétiques de la réaction directe	
	Mécanisme réactionnel, Haldane pour la réaction globale	52
4.4	Inhibition par excès de substrats	67
4.5	Régulation allostérique	72
4.5.1	Mode d'investigation	73
4.5.2	Matériel, méthodes	75
4.5.3	Résultats, discussion	75
	4.5.3.1 Coopérativité homotropique	75
	4.5.3.2 Régulation par les adénosines phosphate	77
	4.5.3.3 Régulation par GTP	84
	4.5.3.4 Régulation par des acides aminés	85
4.5.4	Interprétation	89

5.	INVESTIGATION SUR LA REACTIVITE D'UN GROUPEMENT -SH DE LA GDH	92
5.1	Matériel, méthodes	93
5.2	Résultats	94
5.3	Discussion	96
6.	CONCLUSION	99
	Bibliographie	101

1. INTRODUCTION

La glutamate déhydrogénase (L-glutamate NAD(P) oxydoréductase (déaminative) EC. 1.4.1.2-4 est largement distribuée dans les systèmes vivants. Elle catalyse la réaction réversible :



Seule, et probablement à cause de la fonction qui lui est impartie, la GDH d'origine animale utilise NAD et NADP aspécifiquement.

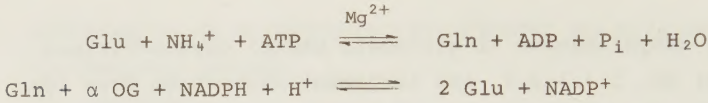
Liée à la matrix mitochondriale, elle joue un rôle central de pivot, entre le métabolisme des hydrates de carbone et la biosynthèse des protéines (via le cycle de l'acide tricarboxylique).

Chaque réactant est utilisé dans de multiples systèmes métaboliques. Le glutamate en particulier, s'intègre à la structure des macromolécules et sert d'unité de synthèse d'une grande quantité de métabolites. (Il est associé à l'amination, à la synthèse de purines, de nucléotides, intervient dans la formation de vitamines, de lipides et de polysaccharides notamment.)

Il faut noter que l'enzyme ouvre une voie pour l'incorporation de l'azote dans les composés organiques.

(Note : A ce propos, il est intéressant de signaler la découverte faite par Tempest (143) (8), chez les mutants de *Klebsiella aerogenes*

nes dépourvus de GDH, d'une autre voie permettant l'assimilation de l'ammoniaque, qui utilise la paire d'enzymes glutamine synthétase - glutamate synthétase. Les réactions catalysées sont, dans l'ordre :



Cette voie d'incorporation de l'azote, qui n'a jamais été observée chez l'animal, semble prédominante chez les bactéries. Elles ont souvent un taux intracellulaire en ammoniaque bas ; par conséquent la glutamine synthétase, qui a une affinité pour NH_4^+ plus grande que la GDH, doit devenir plus rapidement fonctionnelle. Par ailleurs, cette voie catalysée par la paire de synthétase est thermodynamiquement meilleure mais consomme une molécule d'ATP par α OG réduite.

Il a de plus été observé chez *Klebsiella aerogenes* que la glutamine synthétase joue un rôle dans le contrôle génétique du niveau de concentration de la GDH.)

Le glutamate permet un couplage énergétique entre les réactions intra-mitochondriales et la glycolyse, en réoxydant le NADH du cytosol (malate aspartate "shuttle" : figure 1). (19)

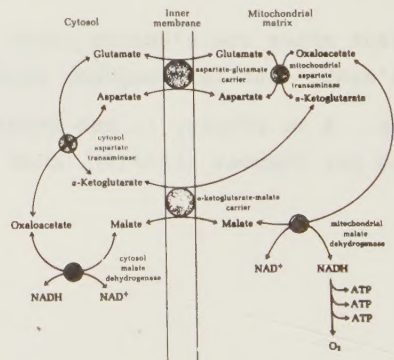


Figure 1. Malate aspartate "shuttle"

La fonction catabolique de l'enzyme, à travers la désamination oxydative du glutamate, a longtemps été jugée importante pour les oxydations métaboliques et la fonction respiratoire. Comme nous le verrons cependant, l'équilibre thermodynamique de la réaction, la rend fortement endergonique.

D'autres analyses militent en faveur d'une fonction biosynthétique de l'enzyme. Chappell (102) notamment, par des expériences de perturbation de la réaction dans des mitochondries isolées de foie de rat, a démontré son indépendance vis-à-vis de l'ammoniogénèse. (Il observait qu'un excès de glutamate entraînait la formation d'aspartate et de 2-oxoglutarate par transamination, sans dégagement de NH_3 .) Il a relevé en même temps que la vitesse de synthèse du glutamate était nettement plus grande que celle de formation de 2-oxoglutarate. Il a de plus estimé qu'au moins trois systèmes permettaient le transport du glutamate à travers la paroi mitochondriale : les glutamate- OH^- , glutamate-aspartate et glutamate-glutamine "antiporter".

Il faut cependant souligner que la complexité d'un tel système in vivo, rend difficile l'obtention de son image intégrée, à cause des interactions, couplages énergétiques, modulations, compartimentations.

Dans le tissu nerveux, le rôle de la glutamate déshydrogénase est amplifié par un métabolisme à "turnover" élevé. (Le cerveau emploie 20 % de l'oxygène total requis par l'homme.) Par ailleurs, le pool de glutamate qui, dans le foie, provient pour une part égale du glucose et du plasma sanguin, est formé presque exclusivement dans le cerveau (dans un rapport 10/1) à partir du glucose (122) (145). Ceci est la conséquence de l'existence d'une barrière hémato-cérébrale qui ne laisse partiellement passer qu'une faible proportion des acides aminés

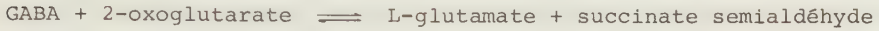
provenant de la circulation sanguine mais qui est perméable notamment au glucose. (L'injection de ce composé marqué au C^{14} va entraîner la présence dans le tissu cérébral, non seulement d'hexoses marqués mais également d'une sensible proportion d'acides aminés marqués qui sont donc largement synthétisés in situ.) De plus, le stock d'acide glutamique + glutamine est exceptionnellement grand, puisqu'il représente près de 60 % de tous les groupes α -amino libre du cerveau.

La régulation du niveau de glutamate est liée à celle des niveaux de l'aspartate et de la glutamine, par l'intermédiaire de la glutamate déshydrogénase, de l'aspartate aminotransférase, de la glutamine synthétase et de la glutaminase (7) (133) (13).

Glu et Gln, par l'intermédiaire de la glutamate déshydrogénase, de la glutamine synthétase et de la glutaminase, participent au strict contrôle du niveau intracérébral de NH_4^+ . Ce ion qui passe la barrière hémato-cérébrale, est important dans le tissu nerveux et sa concentration peut être regardée comme un index biologique de l'activité physiologique ; elle décroît sous anesthésie et augmente dans un état d'excitation (un excédent pouvant devenir létal), reflétant l'altération de certaines voies métaboliques. (125) (72)

Il faut également souligner que la GDH, en synthétisant le glutamate, fournit au tissu cérébral, une des seules voies d'incorporation de l'azote minéral dans les composés organiques. (La carbamoyl phosphate synthétase étant absente dans le cerveau, cette autre voie d'incorporation de l'azote, importante dans le foie, est ici exclue.)

Le glutamate, dans le cerveau, peut aussi être catabolisé en γ -amino-n-butyrat (GABA) par la glutamate décarboxylase. La GABA va permettre à ce tissu d'employer une route alterne comme déviation partielle du cycle de l'acide tricarboxylique. En effet, la GABA-2-oxoglutarate transaminase catalyse la réaction suivante :



Le succinate est ensuite formé par la succinate semialdéhyde déhydrogénase. L'importance de la contribution de ce "GABA-shunt" à l'oxydation du glucose n'est probablement pas encore déterminée. Son rôle pourrait être lié à l'action neurophysiologique de Glu et GABA.

Glu, Asp et GABA sont, en effet, impliqués directement dans un des mécanismes de transmission synaptique du système nerveux central. (38)

Vésiculaire ou cytoplasmique (?), l'acide glutamique jouerait un rôle de neurotransmetteur des synapses excitatrices. Sa libération, comme dans le système cholinergique, serait Ca^{2+} -dépendante et provoquerait un potentiel d'excitation post-synaptique. Une relation entre la quantité de Glu libéré et l'intensité d'excitation n'a pas encore été démontrée. Des récepteurs pourraient être localisés dans la région extrasynaptique de la membrane post-synaptique. L'origine de son action dépolarisante n'est pas encore comprise. L'élimination du neurotransmetteur de l'espace intersynaptique, qui doit nécessairement être rapide, semble être l'apanage de sites présynaptiques à haute affinité.

L'acide aspartique semble jouer, qualitativement, le même rôle.

La GABA agit dans les synapses inhibitrices en provoquant un potentiel d'inhibition post-synaptique, par hyperpolarisation de la membrane post-synaptique (augmentation de la perméabilité

à Cl^- et à K^+). GABA est également impliquée dans les phénomènes d'inhibition présynaptique (liés à la dépolarisation de la membrane présynaptique terminale).

Ainsi excitation et inhibition peuvent obéir à un même pool d'acides aminés (Glu + Gln). En plus, certaines évidences semblent indiquer que le cycle de l'acide tricarboxylique pourrait connecter l'activité des amino-acides neurotransmetteurs à celle de neurotransmetteurs centraux, du type cathécholamines. (9)

L'importance de la glutamate déhydrogénase dans un tel système paraît évidente. Elle se confirme dans le travail de Lai & Clark (90) qui ont observé une plus forte activité de la GDH dans les mitochondries synaptiques que dans les mitochondries non synaptiques.

La diversité des systèmes qui utilisent la GDH dans le neocortex cérébral a justifié que soit complétée et affinée l'analyse de cet enzyme, notamment pour y rechercher une éventuelle adaptation évolutive. La connaissance des propriétés physico-chimiques et catalytiques de la protéine isolée devrait aussi permettre une meilleure interprétation des phénomènes observés in vivo.

2. PREPARATION DE LA GLUTAMATE DEHYDROGENASE DU CORTEX CEREBRAL DE BOEUF

Les techniques d'extraction et de purification de l'enzyme ont été pour une bonne part décrites dans le mémoire de thèse de Schwendimann (130). La solubilité, le poids moléculaire, la conformation de la molécule à pH voisin des valeurs physiologiques étaient à la base du choix des procédés.

Des tests immunologiques ont cependant révélé la nécessité d'accroître le degré de purification de l'enzyme. Les récents développements dans le domaine de la chromatographie par affinité nous ont permis d'obtenir une protéine de pureté plus satisfaisante qu'auparavant.

2.1. Matériel, méthodes d'analyse

DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G 200, Sepharose 4B, 5'AMP-Sepharose (Pharmacia) ; NAD^+ (Merck) ; L-Glu, sel potassique (Sigma) ; glutamate déhydrogénase de foie de boeuf, en suspension cristalline dans du sulfate d'ammonium 2M (Boehringer) ; tubes à dialyse Visking 36/32 (Serva) ; mercaptoéthanol (Fluka) ; phénazine méthosulfate nitrobleu tetrazolium (Calbiochem).

Tous les réactifs utilisés étaient de pureté analytique.

2.1.1. Détermination de l'activité enzymatique

La réaction enzymatique était généralement déterminée par la vitesse de formation du NADH, mesurée à 340 nm, à température

ambiante dans une cuvette de 1 cm de chemin optique. Le milieu réactionnel (3 ml) contenait $5 \cdot 10^{-5} \text{ M NAD}^+$, $1,1 \cdot 10^{-2} \text{ M L-Glu}$ et 0,1 ml de solution d'enzyme, dans du tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7,7. Une relation linéaire entre l'activité et la concentration d'enzyme avait été établie en utilisant la GDH de foie, à des concentrations comprises entre 0,1 et 3 $\mu\text{g/ml}$. La concentration de l'enzyme du cerveau était calculée sur la base de cette droite d'étalonnage.

2.1.2. Détermination de la quantité de protéines

Les protéines ont été dosées par la méthode de Lowry & al. (97) avec la serumalbumine comme standard.

Elles l'ont été également par des mesures d'absorbance, en utilisant initialement et provisoirement l'absorptivité spécifique de l'enzyme du foie à 279 nm, $0,97 (\text{mg/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Olson & Anfinsen (111)).

Enfin, dans les premières étapes d'extraction, leurs concentrations pouvaient être mesurées par la lecture de l'absorbance à 280 et 260 nm et utilisation de la relation empirique décrite par Layne(92): $\text{concn. (mg/ml)} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$

2.1.3. "Disc-gel" électrophorèse

La méthode de Ornstein & Davis (113)(39) était appliquée, utilisant 7,5 % d'acrylamide, et un tampon Tris-glycine pH 8,3. (Courant de 4 mA par tube, durant 2h, avec du bleu de bromophénol comme marqueur.) La coloration des protéines était obtenue par le bleu de Coomassie G 250. (100 mg dissous dans 20 ml de méthanol, 4ml d'acide acétique et 20 ml d'eau. Coloration 1h à 60 °C, décoloration électrophorétique dans l'acide acétique 7%) (115)

L'activité enzymatique était mise en évidence sur le gel , par la réaction colorée du NADH produit, avec du phénazine méthosulfate et du nitroblue tetrazolium (51). (Mélange réactionnel : 10 ml de tampon phosphate de K 0,2M pH 7,7 2 ml de Glu 1M, 10 mg de NAD⁺, 0,05 ml de PMS $1,63 \cdot 10^{-2}$ M, 0,5 ml NBT $1,22 \cdot 10^{-2}$.)

2.1.4. Electrophorèse sur agarose

Elles étaient faites sur un support d'Agarose 1% dans du tampon Vèronal 50mM pH 8,2 (plaques carrées de 10 cm de côté) au moyen d'un appareil Camag. Les gels étaient colorés au bleu de Coomassie ; le gel d'activité était préparé selon le procédé décrit par Schwendimann (130).

2.1.5. Immunoélectrophorèse

Cette technique analytique, de même que le procédé utilisé pour l'obtention d'anti-serum de GDH seront décrits en chapitre 3.6.

2.2. Résultats, discussion

2.2.1. Extraction, purification

Des deux techniques d'extraction décrites par Schwendimann, soit par isolement des mitochondries ou par préparation de poudre acétonique d'organes, la seconde a été choisie, pour la rapidité de son exécution et de la facilité de stockage de l'extrait brut.

Le néocortex de dix cerveaux de boeuf, préalablement homogénéisé (omnimixer Sorvall), était agité une nuit à -20°C dans 15 l d'acétone, puis après filtration sur Büchner, 5 h dans 8 l de butanol. Après une nouvelle filtration, l'homogénat était lavé avec 3 l d'acétone et 2 l d'éther et séché pendant une nuit à l'air. Les 400 g environ de poudre acétonique étaient conservés à -20°C .

100 g de poudre acétonique étaient employés pour chaque préparation. Extraite pendant une nuit dans 1,2 l d'eau, elle était centrifugée à 8000 rpm. dans une centrifugeuse Sorvall RC-2B (rotor GSA). Le surnageant contenant l'enzyme était ensuite dialysé durant une nuit contre 15 l de tampon phosphate de potassium 0,05 M pH 7,5 puis mélangé en "batch" durant 3 h avec 500 ml de DEAE-Sephadex A-50 équilibré dans le même tampon. Le gel était ensuite introduit dans une colonne, lavé pendant 24 h avec le tampon puis l'enzyme élué par adjonction de KCl 0,15 M au tampon.

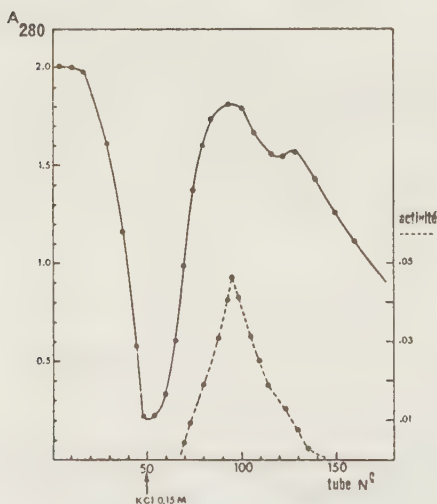


Figure 1. Chromatographie sur DEAE-Séphadex A-50

Caractéristiques de la colonne :

diamètre : 4 cm ; hauteur : 60 cm ; débit : 60 ml/h ; fractions : 8 ml

Tampon d'équilibration : phosphate de K 0,05 M, pH 7,5.

Elution par adjonction de KCl 0,15 M.

Absorbance à 280 nm : ——— Activité : - - - - -

Les protéines étaient précipitées par l'adjonction de 22 g% de Na_2SO_4 solide, à température ambiante, en présence de $\sim 20 \mu\text{l}$ de mercaptoéthanol. Le précipité, après centrifugation à 18000 rpm. était redissous dans environ 50 ml de tampon phosphate de potassium 0,05 M pH 7,5, et à nouveau précipité, à 4 °C, avec du sulfate d'ammonium solide, jusqu'à un degré de saturation de 45 g%. Les protéines, redissoutes dans 15 ml de tampon, étaient chromatographiées sur du Sephadex G 200.

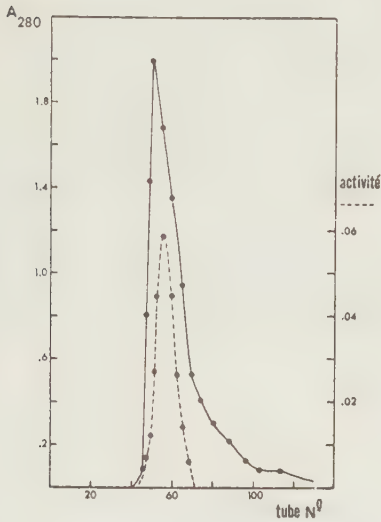


Figure 2. Chromatographie sur Séphadex G 200

Caractéristiques de la colonne :

diamètre : 4 cm ; hauteur : 100 cm ; débit : 30 ml/h ; fractions : 8 ml

Tampon d'élution : phosphate de K 0,05 M, pH 7,5

Absorbance à 280 nm : ——— Activité : -----

Les fractions enzymatiquement actives étaient précipitées par du sulfate d'ammonium jusqu'à 45 g% de saturation, en milieu réducteur. Le précipité, redissous dans 10 ml de tampon phosphate de potassium, était passé sur une colonne de Sepharose 4B.

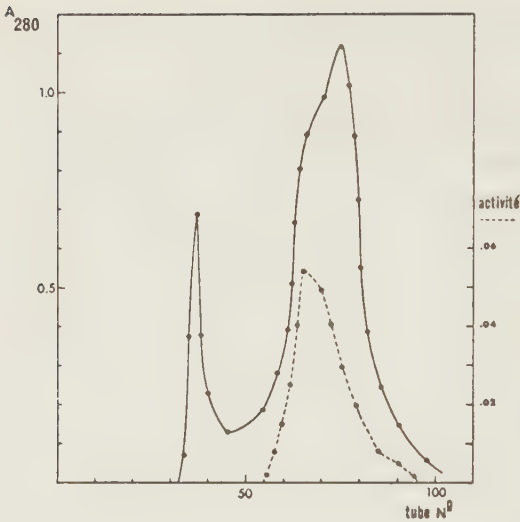


Figure 3. Chromatographie sur Sépharose 4B

Conditions : Comme en figure 2.

L'enzyme était à nouveau concentré par précipitation avec du sulfate d'ammonium solide, jusqu'à 45 g% de saturation, en milieu réducteur.

A ce stade de la préparation, l'activité spécifique était environ 50 % inférieure à celle de l'enzyme du foie.

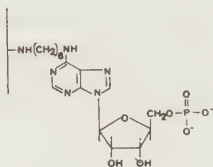
Des tests immunologiques ont cependant permis de déceler des protéines contaminantes. Elles ont été éliminées par chromatographie d'affinité.

2.2.2. Chromatographie sur 5'-AMP-Sepharose

(Note préliminaire : L'usage de la chromatographie d'affinité pour la purification des déhydrogénases s'est considérablement développé. Pour la glutamate déhydrogénase du foie, plusieurs types de ligands, des co-facteurs ou des coenzymes substitués à la résine, ont déjà été testés.

Godinet & al (61), utilisant du GTP-Sepharose, ont obtenu une fixation suffisante de l'enzyme. D'autres Sepharoses, substitués notamment par ϵ -amino-caproyle-NAD (ou 5'-AMP), n'ont pas permis de récupérer de l'enzyme chromatographié (96). Dans cette série d'expériences, le N⁶-(6-amino-hexyl)-5'-AMP-Sepharose donnait des résultats satisfaisants, mais le même gel préparé par une voie de synthèse différente, par Craven (28) n'a pas permis la récupération de l'enzyme. Ces résultats contradictoires doivent trouver leur origine dans le choix de tampons de forces ioniques trop basses, qui déstabilisaient la GDH.

Le gel commercialisé par Pharmacia est formé par couplage sur Sepharose de N⁶-(6-aminohexyl)-5'-AMP



La concentration du ligand est d'environ 2 μ M par ml de gel gonflé. L'affinité, faible, de la GDH du cerveau pour ce gel était améliorée par l'abaissement simultané du pH, de la force ionique et de la température, pour des raisons expliquées par Harvey & al (69) (70).)

L'enzyme, sous forme précipitée, était dissous dans un volume minimum de tampon phosphate de potassium 0,05 M pH 6,4 et chromatographié sur une colonne de 5'-AMP-Sepharose 4B (diamètre : 1 cm ; hauteur : 10 cm ; débit : 6 ml/h ; fractions : 1,8 ml). La colonne était lavée avec 40 ml de ce tampon puis

l'enzyme élué avec du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,5 ; la colonne était finalement lavée avec ce tampon contenant KCl 1 M.

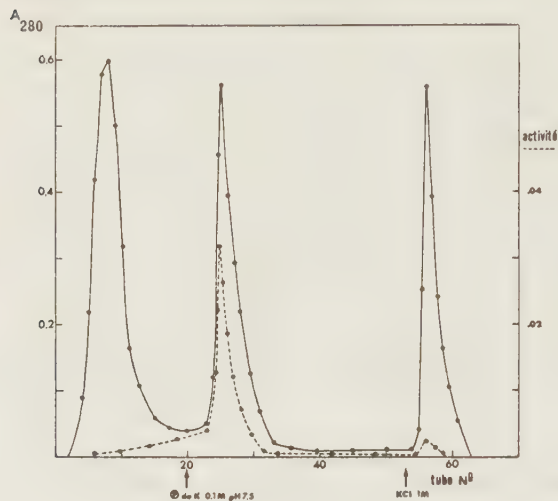


Figure 4. Chromatographie sur 5'AMP-Sépharose 4B

Conditions décrites dans le texte.

Absorbance à 280 nm : ——— Activité : - - - -

Les principales caractéristiques de chaque étape de l'extraction figurent en table 1.

Le rendement global de la préparation, calculé à partir de l'étape d'extraction de la poudre acétonique, est de 60 %.

Il faut observer que l'activité spécifique de la GDH de cerveau est voisine ou identique à celle de l'enzyme du foie (ce dernier ayant servi de référence pour la détermination des concentrations de l'enzyme extrait).

Table 1. Résultats de la purification de la glutamate déshydrogénase du cortex cérébral

Etapes	Protéine (mg)	Enzyme (mg)	Rapport	Facteur	Rendement (%)
Extraction	9200	89	0,010	-	-
DEAE-Sephadex	1100	70	0,064	6,56	78,6
Na ₂ SO ₄ 22 %	520	65	0,125	1,95	73,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ 45 %	280	63	0,225	1,80	70,8
Séphadex G200	225	60	0,267	1,20	67,4
Sépharose 4B	124	54	0,440	1,65	60,7
5'AMP-Sépharose	54	52	0,963	2,15	58,4

2.2.3. Cristallisation

Elle était obtenue par l'adjonction lente de sulfate d'ammonium, sous agitation, jusqu'à une saturation de la solution d'environ 20 %.

Les cristaux obtenus ont déjà été décrits par Schwendimann (130)

L'impossibilité d'obtenir des cristaux de grande tailles a été discutée par Josephs (81). Ses observations au microscope électronique ont montré que l'étape initiale de la cristallisation correspondait en réalité à l'association réversible de quatre chaînes d'enzyme polymérisé, en structures tubulaires avec un axe hélicoïdal commun. La multiplicité des structures tubulaires formées doit empêcher la croissance de grands cristaux. (Existence d'un équilibre topologique.)

2.2.4. Critères de pureté ; homogénéité chimique et antigénique

Différentes techniques ont permis de rendre compte de la pureté de cet enzyme.

- "Disc-gel" électrophorèse

Les gels ont révélé plusieurs bandes actives, correspondant à différents états d'agrégation de l'oligomère. Aucune bande protéique contaminante n'était visible.

- Electrophorèse sur Agarose

La GDH du cerveau ne forme qu'une seule bande après migration sur Agarose (figure 5). La différence de mobilité entre les enzymes du foie et du cerveau est bien mise en évidence.



Figure 5. Electrophorèse sur plaque d'agarose

Conditions expérimentales : Agarose 1 % dans du tampon Véronal 0,05 M pH 8,2
Tension : 20 V/cm Temps de migration : 2 h. Coloration : Bleu de Coomassie

1. GDH du foie 2. GDH du cerveau 40 μ l de solutions 3 mg/ml

- Immunoélectrophorèse

Un antisérum de glutamate déhydrogénase du cerveau a été obtenu par immunisation de lapins, avant que la chromatographie d'affinité sur 5'-AMP-Sepharose ne soit utilisée comme étape finale de purification. Cette immunoélectrophorèse a mis en évidence certaines immunoglobulines contaminantes, visibles en figure 6a, où les antisérums des enzymes du foie et du cerveau sont comparés.

Les effets de la chromatographie supplémentaire sont montrés en figure 6b. Un seul arc de précipitation est obtenu pour une série de concentrations variables d'antigène.

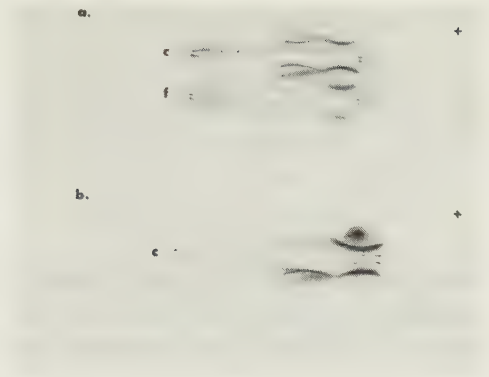


Figure 6. Immunoélectrophorèses de GDH

a. GDH de cerveau, avant chromatographie sur 5'-AMP Sepharose

b. GDH de cerveau, après chromatographie sur 5'-AMP Sepharose

c et f correspondent, respectivement, aux antisérums des GDH de cerveau et de foie

Conditions expérimentales : Agarose 1 % dans du tampon Véronal 0,1 M pH 8,2.

Tension : 25 V aux bornes. Temps de migration : 1 h à 4 °C.

Temps de diffusion : 24 h. dans LiCl 9 %.

Concentration d'antigènes : 10 mg/ml 20 λ par puit Anticorps : 50 λ

Les constatations de Talal(142) et Tomkins(144) qui, dans leurs travaux, mettaient en évidence plusieurs arcs de précipitation, qu'ils rattachaient à autant d'états d'agrégation de l'enzyme, ne semblent pas être confirmées.

- Sédimentation à l'équilibre

Décrite ultérieurement (chapitre 3.4.), cette technique a permis de montrer que l'enzyme, dissocié en protomère par du chlorhydrate de guanidine 6M, avait une grande homogénéité. Aucune courbure n'était discernable dans le graphe $\ln c$ versus x^2 , ce qui permet d'exclure toute hétérogénéité physique.

Ces différentes expériences conduisent à admettre que cette déhydrogénase est pure.

3. PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE LA GLUTAMATE DEHYDROGENASE DU CERVEAU

Certaines propriétés physico-chimiques de la glutamate déhydrogénase du cortex cérébral de boeuf sont décrites dans le mémoire de thèse de Schwendimann. (130)

Ainsi le point isoélectrique a été estimé à 4,9 (GDH du foie : $pI = 5,4$). Le poids moléculaire a également été déterminé ; il en sera discuté dans ce chapitre.

L'arrangement des six sous-unités de l'oligomère a été déterminé à partir de micrographies électroniques et correspond à celui observé pour l'enzyme du foie. Les protomères, représentés sous trois angles différents, sont conformés comme suit : (45)



Nous poursuivons, dans ce chapitre, les investigations sur les caractéristiques moléculaires de la protéine.

3.1. Absorptivité de l'enzyme natif

Le problème que pose l'établissement précis de ce paramètre réside dans la détermination exacte de la quantité de protéine en solution. La technique de micro-Kjeldahl de dosage de l'azote, utilisée autrefois, a dû être écartée, car il est difficile, comme le soulignait Sund (139), d'obtenir la GDH libre de tout ion ammonium, substrat de cet enzyme. La concentration a été déterminée par pesée de l'enzyme desséché sous conditions strictement contrôlées.

L'effet de dispersion optique sur la valeur de l'absorptivité, provoqué par l'agrégation de la molécule d'enzyme, a été mesurée par la méthode de Malcolm (98).

3.1.1. Matériel, méthodes

- Enzyme en solution dans H_2O - D_2O

Le dessalage de solutions de l'enzyme a été fait par chromatographie ultrarapide sur Sephadex G25 fine en centrifugeuse.

Huit tubes de polyallomère (diamètre : 1 cm, hauteur : 10 cm), percés au fond, et remplis de gel préalablement équilibré dans l'eau, étaient emboîtés dans des tubes à fond conique ; le gel était ensuite drainé par centrifugation pendant 2 min à 3000 rpm.

Une solution d'enzyme (~ 10 mg/ml), dialysée pendant une nuit contre du KCl 1M, était placée, par fractions de 0,2 ml, à la surface des gels drainés et centrifugée durant 1 min à 3000 rpm. L'enzyme était récolté dans les tubes coniques contenant 0,1 ml

d'eau lourde (Merck). Le dessalage de la solution était vérifié au conductivimètre (Radiomètre), équipé d'une sonde CDC-314, préalablement étalonnée avec du KCl.

L'absorbance d'une aliquote diluée dans du tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7,5, était lue au spectrophotomètre Zeiss PM-Q II. 1 ml de solution était évaporé à 80 °C dans une étuve (Salvis), puis chauffé durant 2 h à 110 °C et refroidi sous vide dans un dessiccateur, sur P₂O₅. L'enzyme était finalement pesé sur une micro-balance (Mettler). Le procédé de séchage était répété jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

- Enzyme en solution dans un tampon volatile

La GDH était dialysée 48 h contre 3 x 2 litres de tampon carbonate d'ammonium 0,1 M pH 7,7. L'extinction et le poids sec étaient obtenus comme précédemment.

- Enzyme en solution dans du tampon phosphate

(Procédé utilisé par Egan (43) pour la GDH de foie)

L'enzyme, 15 mg/ml, était dialysé contre 2 x 1 litre de tampon phosphate de potassium 0,05 M pH 7,7 puis durant 24 h contre 1 litre de ce tampon. Les mesures d'extinction et la double pesée étaient effectuées comme précédemment.

- Détermination de la contribution du "light scattering"

L'absorbance de l'enzyme dans le tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7,5 était mesurée entre 320 et 450 nm. L'extrapolation à 280 nm, de la droite obtenue dans un diagramme semi-logarithmique $\log A$ versus λ permettait d'estimer cet effet.

3.1.2. Résultats

Chaque expérience a été répétée deux fois et chaque détermination de l'absorbance était faite avec deux dilutions de l'enzyme.

$$\epsilon_{280}^{0,1\%} = 0,99 \pm 0,02 \quad (\text{cm}^2 \text{mg}^{-1})$$

La figure 1. permet la détermination de la contribution du "light scattering" à l'absorptivité.

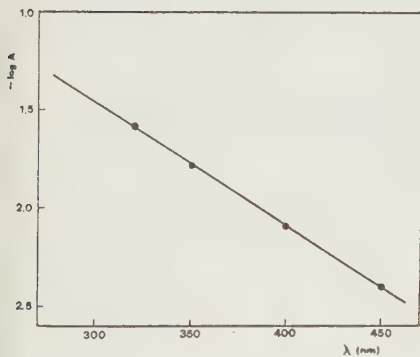


Figure 1. Graphe du log de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde, d'une solution de GDH dans du tampon phosphate de K 0,2 M pH 7,5. ($A_{280} = 0,508$)

La concentration d'enzyme était voisine de celle employée pour les mesures d'extinction. (Le degré de polymérisation est fonction de la concentration en GDH.)

La valeur d'absorbance obtenue par extrapolation à 280 nm vaut 0,046 ; elle représente environ 10 % de l'absorbance mesurée (0,508).

3.1.3. Discussion

La solubilisation de l'enzyme dans $H_2O - D_2O$ s'est révélée délicate. Des problèmes résidaient dans l'optimisation de la méthode. Une faible variation de la longueur des colonnes de chromatographie ou des vitesses et du temps de centrifugation provoquaient souvent une dénaturation complète de l'enzyme dans le gel, ou bien sa libération avec le solvant contenant le sel.

Il faut noter une nette stabilisation de l'enzyme à force ionique nulle ou presque, par la présence de l'eau lourde (absence de précipitation durant 24 h à 4 °C) qui, en modifiant la constante diélectrique du solvant, agit sur l'affinité des liaisons hydrogènes et hydrophobes et partant, sur la stabilité conformationnelle et sur le contenu en eau de la molécule.(93) Un effet d'association des oligomères est aussi supposé pour la GDH. (45)

La valeur du coefficient d'extinction, comme la composition en acides aminés le laisse prévoir, paraît similaire à celle observée pour l'isoenzyme du foie. (111) (43) (98)

3.2 Composition en acides aminés

Les amino-acides composant la GDH ont été déterminés en utilisant les méthodes d'hydrolyse et d'analyse décrites par Moore & Stein (109). La méthode de Lin & Chang (94) à l'acide p-toluène sulfonique, a servi au dosage du Trp. Le contenu en CysH a été vérifié en utilisant le réactif d'Ellman (46) et la S-carboxyméthylation (29).

3.2.1. Matériel, méthodes

- Hydrolyse, analyses

Des fractions de 0,5 mg environ étaient dissoutes dans du HCl 6N et hydrolysées dans des tubes Pyrex scellés sous vide, durant 24, 48 et 72 h, à 108 °C. Les hydrolysats étaient ensuite évaporés à sec puis, après deux lavages à l'eau, étaient repris dans 0,2 ml de tampon citrate de sodium 0,02 M pH 2,2 et analysés sur un Amino-Acid Analyzer Beckman Model 120C, muni d'une colonne de 65 cm de micro-résine Beckman AA-15. L'élution des acides aminés était faite par un système à trois tampons, selon Gürther (65). Chaque expérience était répétée trois fois.

Parallèlement, deux échantillons de protéine étaient hydrolysés par 1 ml d'acide p-toluènesulfonique 3N en présence de 0,2 % de tryptamine, à 108 °C durant 24 h puis étaient analysés sur une colonne de 15 cm de résine PA-35.

Le nombre de nanomoles recouvré pour chaque résidu était estimé par intégration des pics du diagramme d'élution et comparaison avec les "color values" d'un mélange de calibration.

Une extrapolation à temps zéro était faite graphiquement pour les acides aminés instables en milieu fortement acide.

Val et Ile requièraient au moins 72 h d'hydrolyse pour une libération complète.

- Réduction et S-carboxyméthylation (Dosage de Cys + CysH)

Avant l'hydrolyse, l'échantillon était traité selon le procédé décrit par Crestfield, Moore & Stein (29).

- Détermination spectrophotométrique du nombre de CysH

Une quantité connue d'enzyme dissous dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 - Guanidine-HCl 6M réagissait avec un excès de 5-5' dithiobis-2-nitrobenzoate (DTNB). L'absorption était mesurée à 412 nm. L'absorptivité molaire du 3-carboxylate-4-nitrothiophénolate complexé aux groupes -SH est, à cette longueur d'onde, de 11400. (123)

3.2.2. Résultats, discussion

La table 1 donne la composition en acides aminés de la glutamate déhydrogénase du cerveau et la table 2 permet de la comparer à celle obtenue pour l'isoenzyme du foie.

Table 1. Composition en acides aminés de la GDH de cerveau de boeuf

Acides aminés	%/pds résidu _b	N résidus/ molécule _a	σ	N approché résidus/moléc.
Lys	7,58	32,93	0,52	33
His	3,30	13,41	0,20	13
Arg	8,23	29,34	0,14	29
Asp+Asn	10,55	51,21	0,71	51
Thr	5,04	27,80	0,21	28
Ser	4,72	30,18	0,43	30
Glu+Gln	11,82	51,10	0,68	51
Pro	3,97	22,77	0,22	23
Gly	4,82	47,08	0,53	47
Ala	5,17	40,36	0,63	40
CysH _c	1,08	5,85	0,12	6
Val	6,13	34,38	0,37	34
Met	2,95	12,70	0,22	13
Ile	6,87	33,80	0,26	34
Leu	6,74	33,14	0,18	33
Tyr	5,03	17,05	0,21	17
Phe	5,74	21,72	0,22	22
Trp	1,15	3,45	0,10	3-4

a. Un poids moléculaire de 56000 était considéré pour la sous-unité polypeptidique.

b. Valeurs calculées à partir du nombre de résidus par molécule.

c. Aucune cystine n'a été mise en évidence.

Table 2. Comparaison de la composition en acides aminés de la glutamate déhydrogénase de foie et de celle de l'enzyme du cerveau

Acides aminés	GDH de foie		GDH de cerveau	
	moyenne ou valeurs extrapolées _a	séquence ₍₁₀₈₎		Limite de confiance (Probabilité de 95%)
Lys	33,0	33	32,93	0,40
His	12,6	14	13,41	0,15
Arg	28,3	30	29,34	0,11
Asp+Asn	51,8	50	51,21	0,55
Thr	28,6	28	27,80	0,52
Ser	30,2	30	30,18	1,07
Glu+Gln	47,4	45	51,10	0,52
Pro	20,0	21	22,77	0,17
Gly	48,9	47	47,08	0,41
Ala	38,4	37	40,36	0,49
CysH	6,4	6	5,85	0,10
Val	34,8	34	34,38	0,92
Met	12,8	13	12,70	0,17
Ile	37,6	37	33,80	0,64
Leu	31,4	31	33,14	0,14
Tyr	17,7	18	17,05	0,16
Phe	22,8	23	21,72	0,17
Trp	3,4	3	3,45	0,12
Σ :	506,1	500	508,2	

a. La colonne donne des valeurs moyennes ou extrapolées depuis les analyses de Landon & al.(91), Sund & Akeson (140) et Appella & Tomkins (3). Dans chaque cas, les valeurs reportées par ces auteurs ont été ajustées pour un poids moléculaire de 56000 pour le monomère.

Certains acides aminés sont vraisemblablement plus nombreux (Glu+Gln, Pro, Ala, Leu) ou moins (Ile) dans l'enzyme du cerveau que dans celui du foie, mais l'analogie de composition est tout de même évidente et reflète les similitudes enregistrées dans cette étude.

3.3. Volume spécifique partiel $\bar{v}$

Mesuré à une concentration c (g/ml),

$$\bar{v}(c) = \frac{1}{\rho_2} \left(1 - \frac{\rho}{c} \rho_2 \right)$$

où ρ et ρ_2 sont les densités de la solution et du solvant respectivement.

$\bar{v}$ peut notamment être obtenu par des mesures différentielles de densités en employant un densimètre fonctionnant sur la base de systèmes d'oscillateurs mécaniques. (88) La sédimentation à l'équilibre dans $H_2O - D_2O$ permet également d'obtenir ce paramètre. (42)

3.3.1. Méthode

Nous l'avons calculé à partir de la composition en acides aminés, par la relation valable pour les protéines globulaires (126)

$\bar{v} = \sum v_i w_i / \sum w_i$ où v_i correspond au volume spécifique partiel des résidus, déterminé par Cohn & Edsall (23), et w_i au % de résidu par poids.

3.3.2. Résultats

Table 3. Calcul du volume spécifique partiel

Acides aminés	w_i	v_i	$w_i v_i$
Lys	7,58	0,82	6,22
His	3,30	0,67	2,21
Arg	8,23	0,70	5,76
Asp	10,55	0,59	6,22
Thr	5,04	0,70	3,53
Ser	4,72	0,63	2,97
Glu	11,82	0,66	7,80
Pro	3,97	0,76	3,02
Gly	4,82	0,64	3,08
Ala	5,17	0,74	3,83
CysH	1,08	0,63	0,68
Val	6,13	0,86	5,27
Met	2,95	0,75	2,21
Ile	6,87	0,90	6,18
Leu	6,74	0,90	6,07
Tyr	5,03	0,71	3,57
Phe	5,74	0,77	4,42
Trp	1,15	0,75	0,86
$\Sigma w_i = 100,80$			$\Sigma w_i v_i = 73,90$

$$\bar{v} = \Sigma w_i v_i / \Sigma w_i = 0,732 \text{ ml/g}$$

(Note : Le volume spécifique partiel de la GDH du foie a été estimé, par Cassman & al (16), à partir d'expériences de sédimentation à l'équilibre dans guanidine-HCl, à 0,735 ml/g. D'autres auteurs (111)(44)(121), donnent comme $\bar{v}$ pour l'enzyme natif, 0,75 ml/g.)

3.4. Détermination du poids moléculaire des sous-unités de l'enzyme par sédimentation à l'équilibre dans guanidine-HCl

Les expressions qui décrivent la distribution de concentration, lors d'une ultracentrifugation de protéines, ont été développées notamment par Svedberg (141), Williams (148) et Fugita (59).

La sédimentation à l'équilibre, selon le procédé d'Yphantis (151), a permis une mesure directe du poids moléculaire de l'enzyme et une mise en évidence de son homogénéité. Par la destruction de la protéine dans une solution dénaturante en milieu réducteur (afin d'éviter la formation de cystines), il a été possible de vérifier l'équivalence des poids moléculaires des protomères tout en évitant l'analyse d'un système polydisperse qui serait la conséquence de la polymérisation de l'oligomère.

3.4.1. Matériel, méthodes

La glutamate déhydrogénase a été équilibrée par dialyse, dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,5 - Guanidine-HCl 6 M (Schwarz Mann, ultra pure) ~ mercaptoéthanol 0,5 %. Les concentrations d'enzyme étaient comprises entre 0,2 et 0,5 mg/ml.

Les secteurs d'une cellule à 6 canaux, étaient remplis avec 0,11 ml de solution d'enzyme et 0,01 ml d'huile (perfluorotributylamine) pour l'échantillon et avec 0,12 ml de solvant et 0,01 ml d'huile pour la référence.

Les centrifugations ont été faites sur une ultracentrifugeuse analytique Spinco Modèle E (Beckmann) équipée d'un "photo-electric scanning system" décrit par Schachman (127) et permettant la mesure dans l'UV. Le rotor était du type An-D. La température était stabilisée à 20 °C. La vitesse de rotation choisie, de 32000 rpm. était de type "high speed" selon la description d'Yphantis. (151)

Des enregistrements de l'absorbance à 280 nm, obtenus par balayage de la cellule, étaient faits après 24 et 48 h. La vitesse de défilement du papier, de 25 mm/sec, permettait l'extension de l'image de la cellule de 1,62 cm à 138 cm.

L'expression utilisée pour le calcul lie le poids moléculaire à la distribution de concentration des particules hydrodynamiques en équilibre avec le solvant.

$$M = \frac{2 RT}{\omega^2 (1 - \bar{v} \rho)} \cdot \frac{d \ln A}{dr^2} \quad \text{où}$$

R (constante universelle des gaz) : $8,315 \cdot 10^7$ ergs/degré.mole

T (température absolue) : 293 °K

ω (vitesse angulaire du rotor en radian.s⁻¹) : $0,10472 \cdot 32000$ s⁻¹

$\bar{v}$ (volume spécifique partiel) : $0,732$ ml.g⁻¹

ρ (densité de la solution) : $1,145$ g.ml⁻¹

La distance radiale r d'une série de points pris tous les 0,5 cm sur l'enregistrement, était calculée à partir de l'expression

$$r = d/F + 5,7$$

avec d = distance sur l'enregistrement en cm depuis la trace du début de la cellule jusqu'au point considéré.

F = facteur d'agrandissement cellule/image (1,62/138)

5,7 : distance réelle en cm, du centre du rotor au bord intérieur de la cellule.

L'absorbance était mesurée pour chaque point défini ci-dessus. Les pentes du graphe $d \ln A / (dr^2)$ étaient calculées par régression linéaire.

3.4.2. Résultats

Les droites de la figure 2 ont été tracées à partir de l'enregistrement de l'absorbance à 280 nm de solutions placées dans trois canaux de la cellule.

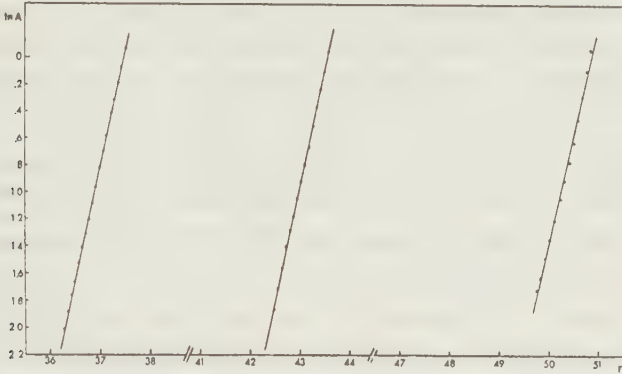


Figure 2. Diagramme d $\ln A_{280} f (dr^2)$ (Sédimentation à l'équilibre).

Conditions expérimentales : GDH (0,48 mg/ml)
dans du tampon phosphate de K 0,1 M pH 7,5 -
guanidine-HCl 6M - mercaptoéthanol 0,5 %.
 ω : 32000 rpm. T : 20 °C.

Les pentes mesurées valent, de gauche à droite, 1,841 , 1,848 et 1,855 (coefficient de régression : $> 0,999$.)

Un poids moléculaire de 50400 ± 2000 est obtenu.

Aucune courbure ne peut être observé sur le diagramme ; cela peut être considéré comme une preuve de l'homogénéité de la protéine. (Le système n'est pas polydispersé.)

3.4.3. Discussion

Différentes déterminations du poids moléculaire de l'enzyme avaient été préalablement faites par Schwendimann (130), utilisant l'électrophorèse sur gel d'acrylamide-SDS, la chromatographie sur Sepharose et la vitesse de sédimentation. Le PM des sous-unités avait été estimé à environ 58000 et celui de l'enzyme natif à environ 340000 (290000 par vitesse de sédimentation avec un $\bar{v}$ sous évalué). Ces résultats permettaient d'admettre l'existence de six sous-unités par molécule d'enzyme.

La sédimentation à l'équilibre, outre qu'elle ait montré l'homogénéité des protomères a permis une mesure du PM en centrifugation, qui soit indépendante du coefficient de diffusion difficile à déterminer.

La valeur obtenue est légèrement plus basse que celle observée par d'autres approches, mais elle correspond à celle obtenue par un procédé analogue par Marler & Tanford (100) pour la GDH du foie.

L'effet du chlorure de guanidine sur la GDH du foie a été discuté par Cassman & Schachman(16). Ils ont démontré l'absence probable de liaisons préférentielles du dénaturant pour le monomère. La légère diminution de $\bar{v}$ était attribué à la dénaturation de la protéine.

3.5. Analyse de la structure secondaire de la glutamate déhydrogénase du cerveau par dispersion optique rotatoire et dichroïsme circulaire

3.5.1. Matériel, méthodes

Les spectres CD et ORD ont été obtenus sur un spectropolarimètre Jasco Modèle J20 (Japan Spectroscopy). Les diverses cellules utilisées avaient des chemins optiques compris entre 0,02 et 0,5 cm. Les solutions étaient à température ambiante ($\sim 22^\circ\text{C}$). Le flux d'azote était stabilisé à 15 l/min. Le réalignement et la compensation de la ligne de base étaient faits avant chaque mesure, en utilisant la même cellule et le même solvant.

L'enzyme, dialysé 12 h contre du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 8,0 - EDTA 10^{-4}M , était ensuite traité au charbon actif (Sigma) puis ultrafiltré sur Millipore de porosité 0,15 μ . Le tampon de référence était également ultrafiltré. Les concentrations de protéine utilisées étaient comprises entre 1 et 0,04 mg/ml.

3.5.2. Résultats, discussion

Un spectre ORD est montré en figure 3. Un effet Cotton négatif peut être observé, avec une intersection à 225 nm. Un maxima de dispersion se présente à 233 nm, un épaulement à environ 215 nm et un autre maxima à 200 nm.

Le point d'inflexion à environ 225 nm était attribué, par Rosenheck (124), à la structure hélicoïdale. L'effet Cotton, mis en évidence par Simmons (132), est également le reflet de l'hélicité.

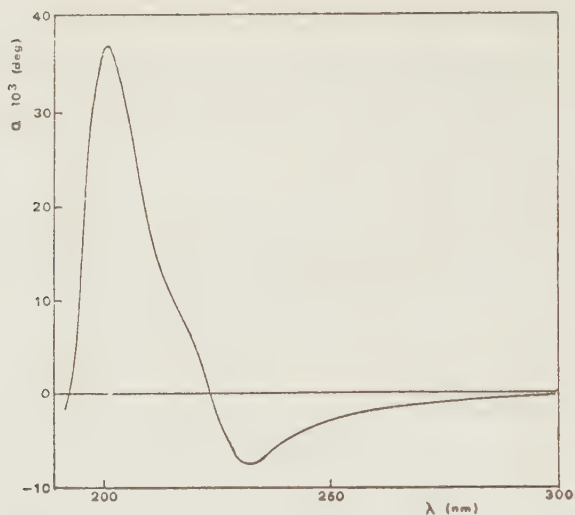


Figure 3. Spectre de dispersion optique rotatoire (ORD)
entre 350 et 195 nm

Conditions expérimentales : GDH : 0,5 mg/ml dans du tampon
phosphate de K 0,1 M pH 8,0 - EDTA 10^{-4} M. Chemin optique :
0,05 cm.

Les contributions relatives de chaque type de structure à la formation du spectre pouvaient être en principe déterminées par la méthode décrite par Greenfield, Davidson & Fassman (62), qui emploie la dispersion rotatoire observée dans l'UV lointain pour des structures pures (hélice α , structure β et conformation random) de poly-L-lysine et autres polypeptides synthétiques, comme référence.

Cependant le spectre CD permet une approche plus directe et plus précise de l'analyse de structures polypeptidiques. En effet, chaque transition électronique optiquement active ne donne qu'une bande dichroïque de largeur finie, pouvant être représentée par une gaussienne.

Au contraire le spectre ORD produit pour chaque transition, deux signaux, l'un positif, l'autre négatif, avec des bandes de largeur indéfinie, ce qui entraîne une interaction de transitions extérieures à la rangée spectrale considérée.

Le passage d'un type de spectre à l'autre peut éventuellement se faire par calcul, à partir d'une transformation de Kronig-Kramers.

La figure 4 montre un spectre CD obtenu pour l'enzyme du cerveau.



Figure 4. Spectre de dichroïsme circulaire (CD) entre 255 et 190 nm

Conditions expérimentales : GDH : 0,62 mg/ml dans du tampon phosphate de K 0,1 M pH 8,0 - EDTA 10^{-4} M. Chemin optique : 0,02 cm

Ellipticités molaires mesurées : — calculées :

L'ellipticité molaire était calculée à partir de l'expression suivante :

$$|\theta|_{\lambda} = \frac{\theta_{\text{obs}} \cdot \text{MRW}}{10 \cdot d \cdot c}$$

avec :

- $|\theta|_{\lambda}$: Ellipticité molaire (deg.cm²dmole⁻¹) à une longueur d'onde λ
- θ_{obs} : Ellipticité observée (degrés d'angle)
- MRW : Poids moyen d'un résidu (calculé depuis l'analyse d'acide aminé) : 111
- d : chemin optique (cm)
- c : concentration (g/ml)

Table 5. Ellipticité molaire des maxima du spectre CD
(Valeurs moyennes obtenues pour des concentrations d'enzyme comprises entre 0,05 et 0,45 mg/ml.)

longueur d'onde (nm)	θ (deg.cm ² dmole ⁻¹)
222	- 1,27 ± 0,03
212	- 1,05 ± 0,04
194	+ 2,70 ± 0,20

Les variations enregistrées lors des différentes mesures dans l'UV lointain pourraient être provoquées par une diffraction, sans doute due à la polymérisation réversible de l'oligomère. Ces effets sont discutés notamment par Sjöholm (134).

La valeur de dichroïsme circulaire à une longueur d'onde donnée peut être traitée comme une combinaison linéaire des contributions relatives de chaque type de conformation élémentaire.

$$CD_{\text{mesuré}} = f_{\alpha}CD_{\alpha} + f_{\beta}CD_{\beta} + f_rCD_r$$

f_{α} , f_{β} , et f_r correspondant respectivement aux fractions de structure α -hélice, β et conformation "random".

Connaissant les ellipticités molaires de référence, il est possible, par un programme d'ajustement non linéaire, de décomposer le spectre CD en gaussiennes et de minimiser les différences entre la courbe expérimentale et les valeurs calculées par la relation ci-dessus.

Le programme d'ajustement non linéaire (GENLSS, DeTar(41)) était adapté à une UNIVAC 1108 (programme MINEW (71), bibliothèque de programme UNIVAC 1108).

Les ellipticités molaires de référence ont été déterminées à tous les nm entre 193 et 240 nm par interpolation de Lagrange, à partir des valeurs publiées par Chen (20), valeurs qui représentent une moyenne statistique déterminée à partir de cinq protéines usuelles dont les structures ont été entièrement élucidées par diffraction au rayons X.

Les résultats obtenus sont donnés en table 6.

Table 6. Structure secondaire de la GDH du cerveau

Rangée (nm)	% α	% β	% r
240 - 208	40	10	50
240 - 205	38	19	43

Un meilleur ajustement était obtenu dans la rangée 240-208 nm où les valeurs trouvées reflètent probablement mieux la réalité. Les ellipticités théoriques, calculées tous les nanomètres, sont reportées en figure 4.

La structure tridimensionnelle n'ayant pas été déterminée, la correction proposée par Chen et liée à la longueur de la chaîne, ne peut être effectuée.

Wells (146), pour la GDH du foie, a donné les valeurs suivantes dans la rangée 240-205 nm : α : 42 % β : 13 % r : 45 %.

3.6. Détermination de relations immunologiques entre la glutamate déhydrogénase du foie et celle du cerveau

D'éventuelles différences dans les déterminants antigéniques des deux enzymes ont été recherchées par immunodiffusion sur agarose.

3.6.1. Matériel, méthodes

3.6.1.1. Production d'antisérums

Les anticorps de GDH de foie et de cerveau étaient produits par immunisation de deux lapins

1,5 ml de solution d'enzyme à une concentration de 2 mg/ml était mélangée avec 1,5 ml d'adjuvant de Freund complet (Difco Bacto). La suspension était injectée par voie intramusculaire dans la cuisse d'un lapin. Après 15 et 21 jours, il était procédé à deux autres injections sans adjuvant. Quatre

semaines après la première injection, du sang était prélevé par ponction dans la veine de l'oreille. Pour permettre la coagulation, le sang était laissé 5 h à température ambiante puis 12 h à 4 °C. Le sérum était récolté par centrifugation puis était conservé à - 30 °C.

3.6.1.2. Tests immunologiques

- Immunodiffusion

La méthode décrite par Ouchterlony (114) a été utilisée en employant de l'Agarose (Behringwerke) 1 % dans du tampon Véronal 0,1 M pH 8,2. (Cf. ci-dessous)

- Immunoélectrophorèse (Utilisée pour déterminer la pureté de l'enzyme : Chap. 2.2.4.)

La microtechnique utilisée a été mise au point par Scheidegger (128).

L'électrophorèse des antigènes, dans le même gel que précédemment, était faite à 4 °C durant 1 heure sous une tension de 25 V aux bornes.

Les diffusions libres antigènes-anticorps avaient lieu en chambre humide à 4 °C durant 24 heures. Les gels, lavés 24 heures dans LiCl 9 % puis 10 mn dans H₂O, étaient ensuite séchés à l'air.

Les colorations étaient effectuées au rouge de Lissamine - Rhodamine (82) ou au bleu de Coomassie (115).

3.6.2. Résultats, discussion

Les co-précipitations entre les enzymes du cerveau et du foie

et l'antisérum de la GDH de foie sont visibles à la figure 5 ainsi qu'à la figure 6 du chap. 2.2.4.

L'immunodiffusion permet l'observation, pour des rapports de concentration antigène - anticorps variables, d'un léger éperon accompagnant la forte coalescence des arcs de précipitation. Cet éperon reflète l'existence vraisemblable d'un déterminant antigénique spécifique sur l'enzyme du cerveau.

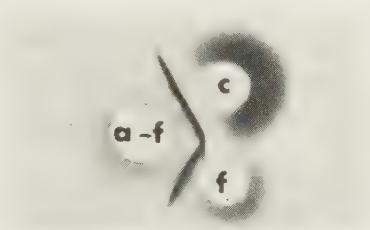


Figure 5. Immunodiffusion sur agarose 1 %

a-f correspond à l'antisérum de la GDH du foie, c et f aux GDH de cerveau et de foie respectivement.

Conditions expérimentales : antigènes : 10 mg/ml, 20 λ par puit.
anticorps : 30 λ

Support : Agarose 1 % dans du tampon Véronal 0,1 M
pH 8,2. Diffusion : 24 h dans LiCl 9 %

4. PROPRIETES CATALYTIQUES DE LA GLUTAMATE DEHYDROGENASE DU CORTEX CEREBRAL DE BOEUF

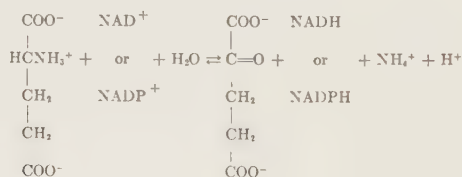
Certains paramètres physico-chimiques obtenus permettent de conclure que les glutamates déhydrogénases de foie et de cerveau sont deux isoenzymes de EC.1.4.1.3. Nous avons poursuivi la comparaison, en faisant une analyse cinétique, afin de mettre éventuellement en évidence des propriétés qui se révéleraient spécifiques de l'enzyme du cerveau.

La cinétique de la réaction d'oxydation du glutamate (réaction inverse) a été largement étudiée par Schwendimann (130), ainsi que l'influence du pH, de certains effecteurs et substrats.

Nous avons complété ces investigations en observant surtout la réaction directe, à savoir celle de synthèse du glutamate, son mode de régulation et sa spécificité. La constante d'équilibre de la réaction globale, déterminée cinétiquement en employant la relation de Haldane, a été comparée à la constante thermodynamique mesurée à partir des concentrations des réactants à l'équilibre.

4.1. Spécificité

La glutamate déhydrogénase catalyse réversiblement l'oxydation - déamination du glutamate en 2-oxoglutarate et en ion ammonium :



L'enzyme du cerveau, comme celui d'autres sources animales étudiées, n'est pas spécifique de l'un ou l'autre de ces deux coenzymes.

La spécificité de l'enzyme du foie vis à vis de substrats analogues du glutamate ou de l'oxoglutarate, du point de vue de la structure chimique ou de la configuration absolue, a été discutée notamment par Fisher (52). Il a postulé que l'enzyme, pour fixer le glutamate, interagit avec le carboxyle α , l'hydrogène α , l' α -amino, les deux hydrogènes γ et le carboxyle γ mais pas avec les hydrogènes β .

Ces résultats étaient compatibles avec ceux qu'a obtenu Caughey & al. (17) par des études d'inhibition. Il a estimé à 7,4 Å la distance séparant les centres cationiques de l'enzyme qui se combinent aux deux groupes carboxyliques des substrats.

La spécificité de l'enzyme du cerveau avait été en partie étudiée (130), afin de définir la structure du site actif.

La réaction étant réversible, nous avons voulu tester des paires de substrats éventuellement présents dans le cerveau, analogues à la paire glutamate / 2-oxoglutarate, et qui pourraient théoriquement être métabolisées par l'enzyme ou le perturber.

4.1.1. Matériel, méthodes

Les mesures de vitesse de réaction ont été effectuées au moyen d'un spectrophotomètre Varian 635. Les cellules étaient thermostatisées à 22 °C.

Les substrats (Sigma, Fluka, Merck, de pureté analytique), les coenzymes (Merck) et l'enzyme étaient en solution à des concentrations de $1,1 \cdot 10^{-2} \text{M}$, $4,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ et 10^{-7}M respectivement, dans du tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7,5.

4.1.2. Résultats, discussion

La table 1. donne la vitesse relative des réactions dans les sens direct et inverse :

Table 1 Activité enzymatique relative de la GDH de cerveau à pH 7,5.

Substrats			
	réaction directe	réaction inverse	
(%)			(%)
100	2-oxoglutarate	L-glutamate	100
-	2-oxoglutaramate	L-glutamine	0,50
1,30	oxaloacétate	L-aspartate	0,25
-	2-oxosuccinamate	L-asparagine	<0,02
0,60	glyoxalate	glycine	0,10
0,20	pyruvate	L-alanine	0,02
1,15	2-oxobutyrate	L-2-aminobutyrate	0,25
0,85	2-oxocaproate	L-norleucine	0,02
0,20	2-oxoisocaproate	L-leucine	0,05
0,15	2-oxo-3-méthylvalérate	L-isoleucine	0,40
3,20	2-oxovalérate	L-norvaline	0,25
0,30	2-oxoisovalérate	L-valine	0,10
0,55	3-hydroxypyruvate	L-serine	<0,02
-	3-hydroxy-2-oxobutyrate	L-thréonine	<0,02
-	6-amino-2-oxocaproate	L-lysine	<0,02
1,05	2-oxoadipate	L-aminoadipate	1,50

L'enzyme du cerveau montre une très stricte spécificité au pH physiologique. Il est peu probable que ces substrats secondaires soient présents à d'assez hautes concentrations,

dans les mitochondries, pour pouvoir entrer en compétition avec le glutamate ou l'oxoglutarate.

Ces valeurs relatives de spécificité, pour la réaction directe d'amination, ne sont pas, à notre connaissance, connue pour l'enzyme du foie. Celles de la réaction inverse sont tout à fait comparables à celles de Struck & Sizer (138) et de Fisher (52) pour l'isoenzyme du foie, et à celles de Barratt & Strickland (5) pour la GDH de *Neurospora*.

Ces auteurs ainsi que Schwendimann & al (129), pour l'enzyme du cerveau, ont cependant noté que la spécificité de la GDH était moins stricte à pH 9-10, pH optima pour la réaction avec les acides monocarboxyliques. L'importance physiologique de ce phénomène n'est pas claire.

La spécificité de la GDH du cerveau vis-à-vis du ion ammonium doit être extrêmement stricte. Elle est sans doute identique à celle observée sur la GDH du foie ; aucune alternative à l'utilisation de ce substrat n'a été observée. Blumenthal & Smith (11) ont noté récemment que la glutamine pouvait être donneur de ions ammonium. Gross & al. (63) ont, peu après, déterminé la présence de NH_4^+ et 5-oxoproline provenant de la conversion de la glutamine; cette contamination de la glutamine explique l'activité enzymatique observée.

4.2. Paramètres thermodynamiques de la réaction enzymatique : Détermination de la constante d'équilibre

La constante d'équilibre (K_c) du système glutamate déhydrogénase avait été mesurée par Olson & Anfinsen (112) puis par Engel &

Dalziel (47). Nous l'avons contrôlée en utilisant l'enzyme du cerveau.

4.2.1. Matériel, méthodes

Les coenzymes (Merck), le glutamate et l'oxoglutarate sous forme de sel potassique (Sigma) et le chlorure d'ammonium (Fluka), de pureté analytique, étaient en solution dans du tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7,5 ($I = 0,5$). NAD a été testé spectrophotométriquement avec l'alcool déhydrogénase (34).

La GDH, en solution dans le même tampon, était préalablement traitée au charbon actif puis filtrée sur Millipore.

Le pH a été lu sur un pH-mètre Orion, équipé d'une électrode combinée Ingold type 3004, à la température d'équilibre.

La réaction catalysée par l'enzyme a été suivie dans chaque sens jusqu'à l'obtention d'un équilibre (vitesse réactionnelle nulle) sur un spectrophotomètre Varian 635, muni d'un support de cellule thermostatisé par un appareil Haake. Un contrôle était fait avec le milieu réactionnel contenant les mêmes solutés excepté le coenzyme.

La concentration du coenzyme réduit, à l'équilibre, était calculée grâce à son coefficient d'extinction molaire de $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 340 nm.(77)

La constante d'équilibre de la réaction globale dérive, pour le sens direct, de la relation :

$$K_c = \frac{(\text{NAD}^+) (\text{glutamate}^-) (\text{H}_2\text{O})}{(\text{NADH}) (\text{2-oxoglutarate}^{2-}) (\text{NH}_4^+) (\text{H}^+)}$$

(Note : Energie libre standard de réaction : $\Delta G_C^0 = -RT \ln K_C$

R : constante des gaz = $1,987 \text{ cal}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

T : température en K.

Constantes thermodynamiques à un pH défini : $K'_C = K_C (H^+)$

$$\Delta G_C^{0'} = \Delta G_C^0 + 2,303 RT \text{ pH}$$

Concentration en eau : $H_2O = 55,56 \text{ M}$ sauf indication.)

4.2.2. Résultats, discussion

La détermination de la constante thermodynamique d'équilibre, donc de l'énergie libre standard, est souvent limitée, en chimie des protéines par l'instabilité de conformation, et partant d'activité de l'enzyme qui catalyse la réaction. Ainsi, la GDH n'est opérationnelle qu'à des forces ioniques supérieures à environ 0,02, à des pH proches de 7,0 et à des températures inférieures à 40 °C.

En tenant compte de ces restrictions, nous avons effectué une vingtaine de mesures, pour chaque sens réactionnel.

Etat d'équilibre atteint par la réaction inverse (désamination oxydative du glutamate) :

$$K_C (I : 0,5 ; T : 300 \text{ K}) = 3,20 \pm 0,2 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-1}$$

$$\Delta G_C^0 = -19,91 \text{ Kcal/mole}$$

$$(K'_C (\text{pH } 7,0) = 3,20 \cdot 10^7 \quad \Delta G_C^{0'} = -10,30 \text{ Kcal/mole})$$

Les mesures ont été faites avec des concentrations initiales de NAD comprises entre $2 \text{ et } 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ et de glutamate comprises entre $0,2 \text{ et } 2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$. Le pH était fixé à diverses valeurs comprises entre 6,5 et 7,5. La concentration d'enzyme était constamment de $0,2 \text{ mg/ml}$ ($\sim 6 \cdot 10^{-7} \text{ M}$).

Etat d'équilibre atteint par la réaction directe (réduction amination de 2-oxoglutarate) :

$$K_C \text{ (I : 0,5 ; T : 300 K) } = 3,08 \pm 0,3 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-1}$$

$$\Delta G_C^{\circ} = -19,89 \text{ Kcal/mole}$$

$$(K'_C \text{ (pH 7,0) } = 3,08 \cdot 10^7 \quad \Delta G_C^{\circ'} = -10,28 \text{ Kcal/mole})$$

Les pH et la concentration d'enzyme étaient équivalents au cas précédent ; les concentrations initiales étaient comprises entre $1,3$ et $2,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ pour NADH, entre $0,5$ et $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ pour 2-oxoglutarate et entre 1 et $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ pour NH_4^+ .

Ces valeurs correspondent à celles observées par Engel & Dalziel (47). Ils ont déterminé par ce type de mesure, les paramètres thermodynamiques caractéristiques du système glutamate déhydrogénase :

Notamment, la constante d'équilibre a été calculée après extrapolation aux conditions standards ($P = 760 \text{ mmHg}$, $T = 298 \text{ K}$, $I = 0$, $\text{H}_2\text{O } 1 \text{ M}$).

$$K_{eq} = 3,38 \cdot 10^{13} \text{ M}^{-2}$$

Le changement d'énergie libre standard de la réaction directe correspond à :

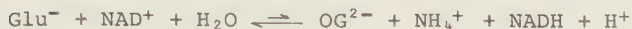
$$\Delta G_C^{\circ} = -18,45 \text{ Kcal/mole}$$

Burton & Krebs (15) ont calculé ΔG° et K_{eq} à partir des résultats de mesures thermochimiques de l'énergie libre de formation du glutamate et de l'énergie libre standard de réduction de NAD^+ .

$$\Delta G^{\circ} = -18,28 \text{ Kcal/mole} \quad \rightarrow \quad K_{eq} = 2,55 \cdot 10^{13} \text{ M}^{-2}$$

La valeur de K_{eq} que nous avons obtenue correspond bien, après extrapolation aux conditions standards, à la constante d'équilibre thermodynamique vraie.

La valeur négative de l'énergie libre ($K_{eq} > 1$) permet de considérer que l'équilibre de la réaction est théoriquement favorable à la synthèse de glutamate



Miller & al (106), dans le cas du cerveau et Williamson & al (149) dans celui du foie, ont estimé que l'enzyme, parce qu'il avait une haute activité enzymatique (parce qu'en haute concentration) et qu'il était entièrement mitochondrial, établissait effectivement un état voisin de l'équilibre, in vivo, entre ses réactants.

En admettant ce postulat pour le système lié à notre isoenzyme, le dosage du glutamate, du 2-oxoglutarate et du ion ammonium peut permettre, à partir de K_{eq} (à 37 °C, pH 7,0), d'estimer par l'équation de Nernst, l'état d'oxydoréduction des mitochondries du cerveau sous différentes conditions (60).

Dans le cerveau du rat, les concentrations des substrats ont été déterminées par Miller & al (106) qui ont obtenus les résultats suivant :

2-oxoglutarate	: 2,39 · 10 ⁻⁴ M
L-glutamate	: 1,21 · 10 ⁻² M
NH ₄ ⁺	: 3,01 · 10 ⁻⁴ M

En admettant que le rapport $\frac{(\text{Glu})}{(\text{OG})(\text{NH}_4^+)}$ dans tout le cerveau reflète le rapport intramitochondrial, le système est à l'équilibre (K'_C (pH 7,0 ; T 310 K) = 2,58 · 10⁵ M⁻¹ (149)) lorsque le rapport $\text{NAD}^+_m/\text{NADH}_m$ est de 1,52

Il faut noter que, s'il était possible de connaître une valeur du rapport NAD^+/NADH dans les mitochondries du cerveau qui ne soit pas obtenue par le procédé de Miller & al (106) (qui juge le système GDH comme étant à l'équilibre), il serait possible de savoir si un sens de la réaction est privilégié, en appliquant la relation :

$$\Delta G'_c \text{ (pH } 7,0 \text{ ; } T : 310 \text{ K)} = \Delta G_c^{\circ'} + RT \ln \frac{\Pi(\text{produits})}{\Pi(\text{substrats})}$$

4.3. Détermination expérimentale des paramètres cinétiques de la réaction directe de synthèse de L-glutamate

Détermination d'un mécanisme réactionnel, Haldane

Les vitesses initiales de la réaction d'amination réductive de 2-oxoglutarate (sens direct), utilisant NADH comme coenzyme, ont été étudiées. Chaque substrat à son tour, a été gardé constant, la concentration des deux autres étant variée alternativement. Des inhibitions par excès de 2-oxoglutarate et de NADH ont cependant limité l'amplitude des variations. Dans les conditions de mesure, les diagrammes double réciproque de premier, deuxième et troisième ordre étaient linéaires.

4.3.1. Mode d'investigation

L'équation de la vitesse, pour une réaction enzymatique ne comportant qu'un substrat, a la forme :

$$v = \frac{dp}{dt} = \frac{V \cdot S}{K_M + S}$$

V représente la vitesse maximale observée lorsque tout l'enzyme est présent sous forme ES. La constante de Michaelis K_M représente la concentration de S lorsque $v = V/2$.

Cette analyse des vitesses de réaction a été développée tout d'abord par Henri (73) puis par Michaelis & Menten (105) à partir de l'hypothèse de l'existence de complexes intermédiaires enzyme - substrat stables, en quasi-équilibre avec l'enzyme et le substrat libre.

Briggs & Haldane (14) ont ensuite élargi le concept en prenant également en considération la vitesse de formation du produit. Ils ont postulé que, très rapidement, lors d'une réaction, le complexe ES se trouve dans un état stationnaire dynamique (steady state) parce qu'il est décomposé et formé à la même cadence.

Ainsi pour la réaction



$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

$$\text{si } k_3 \ll k_2 \quad K_M = \frac{k_2}{k_1} = K_S \quad (K_S : \text{constante de dissociation de ES})$$

$$\text{si } k_2 \ll k_3 \quad K_M = \frac{k_3}{k_1}$$

A partir de l'hypothèse du steady state, Cleland (21) a développé un système d'analyse qui permet d'obtenir des équations de vitesse analogues à celle de Michaelis, pour des réactions enzymatiques réversibles à substrats multiples.

(L'équation la plus simple, par exemple pour un système mono-substrat monoproduit réversible, a la forme :

$$v = \frac{\vec{V} \overleftarrow{V} (s - \frac{p}{K_{eq}})}{K_M \overleftarrow{V} + \overleftarrow{V} s + \frac{\vec{V} p}{K_{eq}}}$$

avec $\vec{V}$ la vitesse maximale dans chaque direction et K_{eq} la constante d'équilibre $k_1 k_3 / k_2 k_4$.)

Les paramètres du type K_M , V , K_{eq} sont mesurables, mais leurs contenus, au niveau des constantes microscopiques, dépendent du mécanisme étudié. Liée à la méthode de King & Altman (83) qui codifie la dérivation des équations différentielles, la méthode de Cleland permet l'analyse de la plupart des mécanismes cinétiques.

Une méthode analogue, décrite par Dalziel (35) (36), pour l'analyse de la cinétique du steady state a été utilisée pour l'étude de la GDH ; elle permet une approche plus directe des mécanismes catalytiques et des paramètres connexes, à partir des résultats expérimentaux, sans fournir cependant, toute l'information de l'équation de Cleland.

Dalziel a défini la réciproque d'une équation empirique de vitesse pour un système ter bi



qui a la forme :

$$\frac{e}{v} = \phi_0 + \frac{\phi_A}{A} + \frac{\phi_B}{B} + \frac{\phi_C}{C} + \frac{\phi_{AB}}{AB} + \frac{\phi_{AC}}{AC} + \frac{\phi_{BC}}{BC} + \frac{\phi_{ABC}}{ABC}$$

e représente la concentration d'enzyme, v la vitesse initiale (p et q égaux à zéro), les paramètres ϕ_0 , ϕ_A , ϕ_B ... sont fonction de constantes de vitesse ou de dissociation particulières pour chaque mécanisme réactionnel possible.

Cette équation est analogue à l'équation de Lineweaver & Burk (95) pour une réaction enzymatique avec un substrat.

$$\frac{e}{v} = \phi_0 + \frac{\phi_S}{S} \quad \text{est équivalent à} \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_M}{V} \cdot \frac{1}{S}$$

ϕ_0 a la dimension de la réciproque d'une constante de vitesse de premier ordre et correspond évidemment à $\frac{1}{V}$.

$\frac{\phi_A}{\phi_0}$, $\frac{\phi_B}{\phi_0}$ et $\frac{\phi_C}{\phi_0}$ correspondent aux constantes de Michaelis pour ces trois substrats lorsque les autres sont saturants pour l'enzyme.

L'obtention de graphes de premier, deuxième et troisième ordre par mesure des vitesses initiales de réaction à plusieurs concentrations de chaque substrat permet donc la détermination des paramètres cinétiques et éventuellement la discrimination des séquences mécanistiques possibles.

4.3.2. Matériel, méthodes

L'enzyme a été équilibré dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,5, traité au charbon actif et ultrafiltré.

Le coenzyme (Merck), le 2-oxoglutarate (Sigma) et le chlorure d'ammonium (Fluka) étaient de qualité analytique puriss.

La concentration en coenzyme réduit était déterminée par mesure

de l'absorbance à 340 nm, en utilisant l'absorptivité molaire de $6,22 \cdot 10^3 \text{ cm}^2\text{M}^{-1}$ (77). Les vitesses initiales (vitesses de disparition de NADH, lues avant que 10 % de la réaction totale n'ait eu lieu) étaient mesurées sur un spectrophotomètre Varian 635 relié à un enregistreur A25. Les cuvettes thermostatisées par un appareil Haake à 22 °C avaient un chemin optique de 1 cm. Les réactions étaient faites dans 3 ml de tampon Tris-HCl 0,2 M pH 7,5. (L'adjonction de l'enzyme ajoutait $3 \cdot 10^{-3}$ M en phosphate.)

Les réactions débutaient à des séries de concentration comprises entre 10 et 40 μM pour NADH, entre 0,5 et 5 mM pour 2-oxoglutarate, et entre 5 et 40 mM pour NH_4^+ .

La concentration de l'enzyme était de 1,5 $\mu\text{g/ml}$ ($4,46 \cdot 10^{-9}$ M pour un PM de l'enzyme de 336000).

4.3.3. Résultats

Notation : A : NADH
 B : 2-oxoglutarate
 C : NH_4^+
 E : enzyme

 I : intersection avec l'ordonnée
 S : pente

 V : vitesse maximale

Dans les diagrammes, la vitesse v est exprimée en $\Delta A_{340} / \text{min}$ (ordonnée) et la concentration de substrat en M (abscisse).

Les graphes de premier ordre ont été tracés en fonction de NADH (OG et NH_4^+ étant substrats "fixe changeant") (figure 1.), les

graphes de second ordre en fonction de NH_4^+ et OG (figure 2.) et ceux de troisième ordre, inversement, en fonction de OG et NH_4^+ (figure 3.).

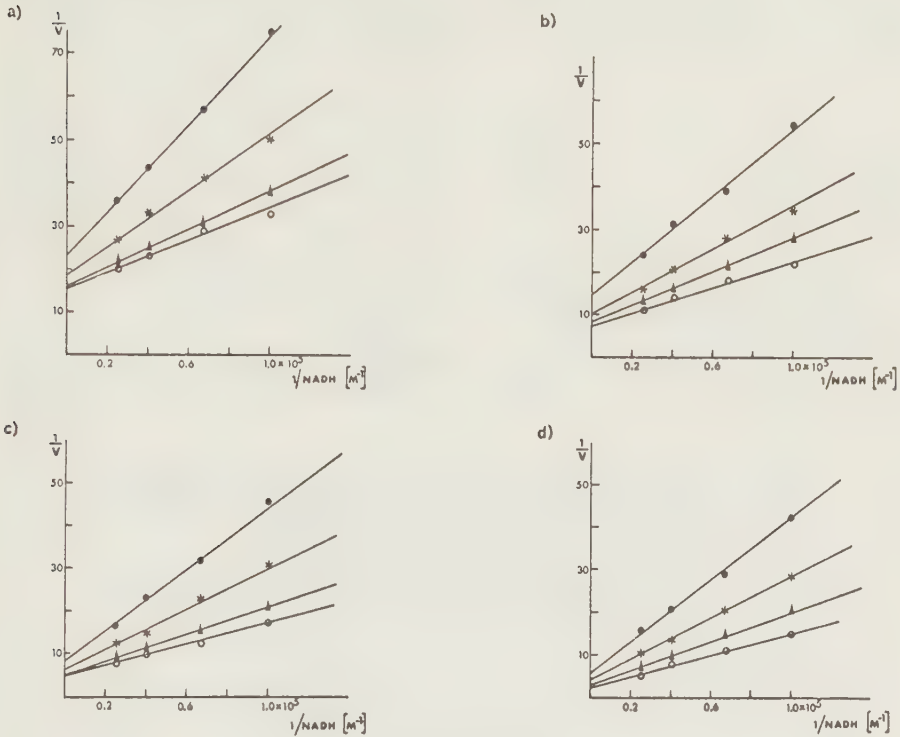


Figure 1. Graphes de premier ordre (Lineweaver & Burk) NADH étant substrat variable, à quatre concentrations de NH_4^+ : a) 5 b) 10 c) 20 d) 40 mM. Dans chaque graphe, la concentration de 2-oxoglutarate était de (●) 0,5 (*) 1 (▲) 2 (○) 5 mM. Réaction dans du tampon Tris-HCl 0,2 M pH 7,5.

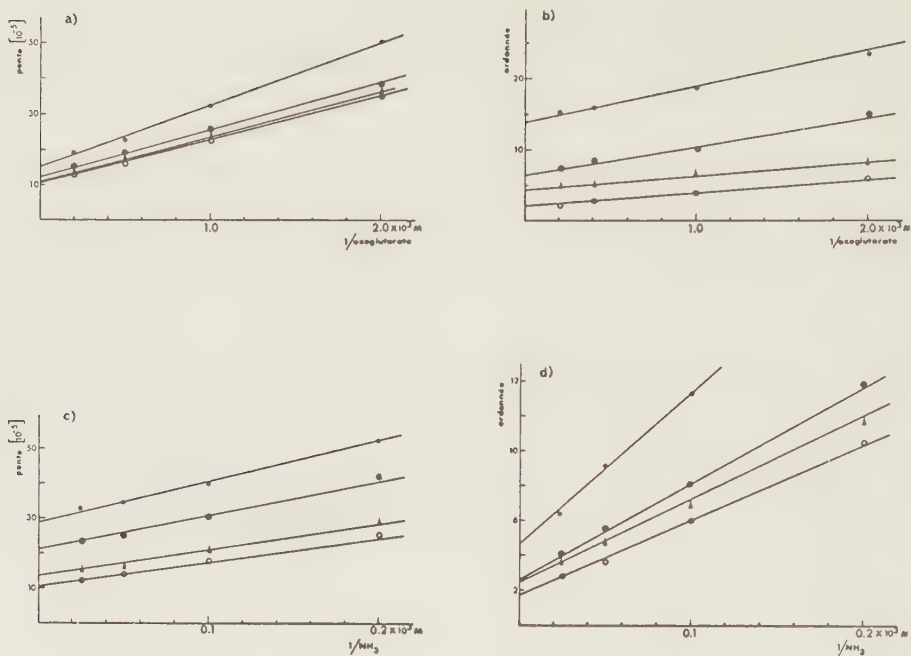


Figure 2. Graphes de second ordre a) pentes b) intersections des graphes de premier ordre, contre la réciproque des concentrations de 2-oxoglutarate pour quatre concentrations de NH_4^+ : (●) 5 (*) 10 (▲) 20 (○) 40 mM.

c) pentes d) intersections des graphes de premier ordre contre la réciproque des concentrations de NH_4^+ pour quatre concentrations de 2-oxoglutarate : (●) 0,5 (*) 1 (▲) 2 (○) 5 mM.

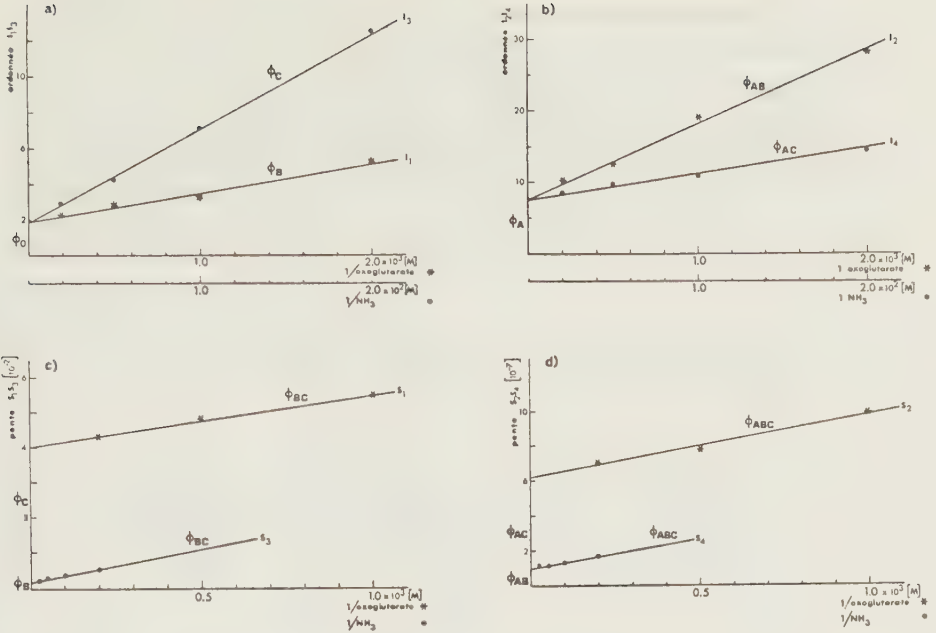


Figure 3. Graphes de troisième ordre

a) Graphe des intersections des figures 2 b et d contre la réciproque des concentrations, respectivement de NH_4^+ et de 2-oxoglutarate.

b) Graphe des intersections des figures 2 a et c contre la réciproque des concentrations, respectivement de NH_4^+ et de 2-oxoglutarate.

c) Graphe des pentes des figures 2 b et d contre la réciproque des concentrations, respectivement de NH_4^+ et de 2-oxoglutarate.

d) Graphe des pentes des figures 2 a et c contre la réciproque des concentrations, respectivement de NH_4^+ et de 2-oxoglutarate.

Des graphes de premier ordre à partir de la réciproque des concentrations de 2-oxoglutarate et de NH_4^+ ont été tracés. Il en a été tiré des graphes de second ordre contre la réciproque des concentrations de NADH, puis de troisième ordre contre la réciproque des concentrations des derniers substrats. Les points obtenus ont permis d'affiner la précision des diagrammes de troisième ordre, mais ils ne sont pas représentés ici.

La valeur des coefficients cinétiques obtenus à partir de deux séries de mesures est reportée en table 2.

Table 2. Coefficients cinétiques de la réaction directe de synthèse du glutamate catalysée par la glutamate déshydrogénase, utilisant NADH.

ϕ_0	:	$3,33 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$	s
ϕ_A	:	$1,21 \pm 0,4 \cdot 10^{-7}$	Ms
ϕ_B	:	$2,75 \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$	Ms
ϕ_C	:	$7,68 \pm 1,2 \cdot 10^{-5}$	Ms
ϕ_{AB}	:	$1,66 \pm 0,3 \cdot 10^{-10}$	M^2s
ϕ_{AC}	:	$0,62 \pm 0,5 \cdot 10^{-9}$	M^2s
ϕ_{BC}	:	$2,30 \pm 0,7 \cdot 10^{-8}$	M^2s
ϕ_{ABC}	:	$6,02 \pm 1,3 \cdot 10^{-13}$	M^3s

Comme le montre cette table, aucun des paramètres de Dalziel de l'équation réciproque de la vitesse ne manque. Tous les complexes de Michaelis pouvant théoriquement se former existent transitoirement.

Les hypothèses de mécanismes séquentiels ordonnés ou non, ou d'équilibre rapide partiel, peuvent donc être sans doute écartées.

L'équation de la réciproque de la vitesse initiale, définie plus haut, représente un système "random", les trois substrats se combinant aléatoirement avec l'enzyme pour donner un complexe quaternaire EABC.

Comme l'a supposé Frieden (55), les substrats doivent être en équilibre rapide avec l'enzyme.

Le mécanisme supposé est schématisé en figure 4.

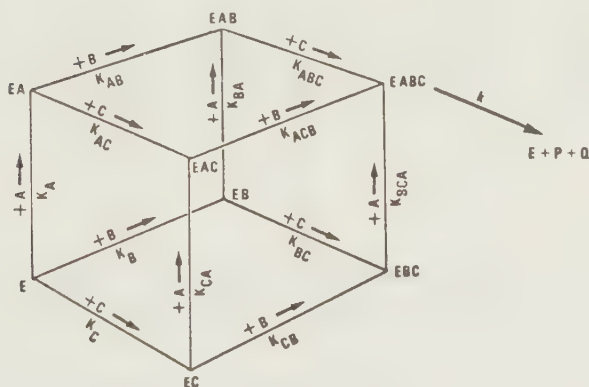


Figure 4. Système d'équilibre rapide "random" pour trois substrats. Mécanisme supposé pour la réaction directe, catalysée par la GDH.

L'équation de vitesse de ce système aléatoire comportant trois réactants en quasi-équilibre est facilement définie en utilisant la méthode de Cha (18).

La vitesse correspond à celle de l'étape limitante : $v = k_{EABC}$

$$\frac{v}{V} = \frac{\frac{ABC}{K_A K_{AB} K_{ABC}}}{1 + \frac{A}{K_A} + \frac{B}{K_B} + \frac{C}{K_C} + \frac{AB}{K_B K_{BA}} + \frac{AC}{K_C K_{CA}} + \frac{BC}{K_B K_{BC}} + \frac{ABC}{K_A K_{AB} K_{ABC}}}$$

avec $V = k_{e_0}$

La réciproque de cette équation de vitesse peut être déterminée :

$$\frac{e_0}{v} = \frac{1}{k} + \frac{K_{BCA}}{k A} + \frac{K_{ACB}}{k B} + \frac{K_{ABC}}{k C} + \frac{K_{CA} K_{ACB}}{k AB} + \frac{K_{BA} K_{ABC}}{k AC} + \frac{K_{AB} K_{ABC}}{k BC} +$$

$$\frac{K_A K_{AB} K_{ABC}}{k ABC}$$

Cette expression est analogue à l'équation réciproque de v contenant les coefficients cinétiques ϕ , définie précédemment.

Les constantes de dissociation de l'équation ci-dessus peuvent donc être obtenues à partir des rapports des coefficients cinétiques. Elles sont données en table 3.

Il faut relever que les paramètres K_{BCA} , K_{ACB} et K_{ABC} correspondent aux K_M de A, B et C respectivement.

Table 3. Constantes de dissociation enzyme - substrats dans du tampon Tris-HCl 0,2 M pH 7,5 (T : 22 °C)
(Constantes exprimées en M.)

Complexes	Substrats dissociés		
	NADH (A)	2-oxoglutarate (B)	NH ₄ ⁺ (C)
EABC	K _B CA = $\phi_A/\phi_0 = 3,63 \cdot 10^{-5}$	K _A CB = $\phi_B/\phi_0 = 8,26 \cdot 10^{-4}$	K _A BC = $\phi_C/\phi_0 = 2,31 \cdot 10^{-2}$
EAB	K _B A = $\phi_{AC}/\phi_C = 8,07 \cdot 10^{-6}$	K _A B = $\phi_{BC}/\phi_C = 3,00 \cdot 10^{-4}$	—
EAC	K _C A = $\phi_{AB}/\phi_B = 6,04 \cdot 10^{-5}$	—	K _A C = $\phi_{BC}/\phi_B = 8,36 \cdot 10^{-3}$
EBC	—	K _C B = $\phi_{AB}/\phi_A = 1,36 \cdot 10^{-3}$	K _B C = $\phi_{AC}/\phi_A = 5,10 \cdot 10^{-3}$
EA, EB, EC	K _A = $\phi_{ABC}/\phi_{BC} = 2,62 \cdot 10^{-5}$	K _B = $\phi_{ABC}/\phi_{AC} = 9,71 \cdot 10^{-4}$	K _C = $\phi_{ABC}/\phi_{AB} = 3,63 \cdot 10^{-3}$

Vitesse maximum de la réaction : $V = \left(\frac{e}{\phi_0}\right) = 1,34 \cdot 10^{-6} \text{ Ms}^{-1}$
Vitesse maximum spécifique (Constante catalytique) : $\left(\frac{1}{\phi_0}\right) = 300 \text{ s}^{-1}$
"Turnover number" : 50 s^{-1}

Détermination cinétique de la constante d'équilibre :

Les relations de Haldane (68) relient la constante d'équilibre aux paramètres de vitesse initiale.

A l'équilibre, la vitesse nette de la réaction est nulle. Ainsi en présence de GDH (à concentration supposée fixe en enzyme actif)

$$k_1 k_2 \dots k_n A \cdot B \cdot C - k_{-1} k_{-2} \dots k_n P \cdot Q = 0$$

Le Haldane de cette réaction à mécanisme aléatoire correspond à

$$\phi_{ABC} / \phi'_{AB} = K_{eq} \cdot (H^+)$$

ϕ'_{AB} , paramètre cinétique de la réaction inverse, a été déterminé pour la glutamate déshydrogénase du cerveau, dans les mêmes conditions expérimentales, par Schwndimann (130).

$$\phi'_{AB} = 2,67 \cdot 10^{-7} \text{ M}^2 \text{s}$$

$$K_{eq} / H^+ = 2,25 \cdot 10^{-6} \text{ M} \quad \text{à pH 7,5 et à une température de } 22^\circ \text{C.}$$

En considérant la concentration de H_2O égale à 55,55 M, la constante d'équilibre correspondante, indépendante du pH, vaut :

$$K_{eq} = 1,28 \cdot 10^{-15} \text{ M}$$

La valeur de cette constante obtenue cinétiquement, est analogue à celle qui avait été mesurée à partir des concentrations des réactants à l'équilibre. (cf. chap. 4.2.)

4.3.4. Discussions

A partir d'études cinétiques à l'état stationnaire, Frieden (55) a défini une séquence mécanistique pour la réaction directe d'amination réductive du 2-oxoglutarate. Il pensait qu'un complexe quaternaire était formé par addition successive sur l'enzyme, dans l'ordre, de NADH, de NH_4^+ et de 2-oxoglutarate. Il basait son argumentation sur l'observation de droites parallèles dans un diagramme analogue à celui de la figure 1 d), signifiant que $\phi_{AB} = 0$, donc que le complexe transitoire (GDH - NADH - 2-oxoglutarate) n'existe pas effectivement.

Nos résultats semblent infirmer cette hypothèse, corroborant au contraire celle de Engel & al (48), qui supposaient un mécanisme de type aléatoire. Pourtant nos conditions expérimentales se rapprochent davantage de celles de Frieden, notamment en ce qui concerne le tampon et les concentrations en substrats.

Des interprétations autres que la cinétique du "steady state" renforcent la thèse du système aléatoire, notamment la mise en évidence directe de complexes transitoires.

Ainsi le complexe (enzyme - NADPH - 2-oxoglutarate) impliquant des déplacements de maxima d'absorbance a été démontré par des mesures en cinétique rapide au "stopped-flow" par di Franco & Iwatsubo (54), puis par spectroscopie différentielle par Cross (31), qui a mis en évidence un "blue shift" de NADPH très typique d'un tel complexe.

L'existence du complexe (enzyme - NADPH - NH_4^+) a été inférée à partir notamment d'une diminution de la fluorescence de NADPH en présence d'ammoniaque (54). Un "red shift" du chromophore de Trp de l'enzyme a permis, par ailleurs, l'identification du complexe (enzyme - 2-oxoglutarate) (32).

Le modèle aléatoire s'est trouvé renforcé encore à la suite des travaux de Hochreiter & Schellenberg (78) (79) qui ont isolé un intermédiaire 2-iminoglutarate à partir de 2-oxoglutarate, de NH_4^+ en présence de la glutamate déshydrogénase. La réaction pouvait être poursuivie par réduction en glutamate au moyen de borohydrure de sodium ou du dithionite de sodium ; elle montrait plusieurs analogies, en particulier pour les régulations, avec la réaction se déroulant en présence de co-enzyme réduit.

Ces séries de résultats, ajoutés à ceux obtenus par des techniques de protection de l'enzyme, d'échanges isotopiques (131) et par des études cinétiques d'inhibition par les produits (49), ont permis d'augmenter considérablement la crédibilité du système aléatoire, avec complexes transitoires en quasi-équilibre.

Les paramètres cinétiques obtenus avec la glutamate déshydrogénase du cerveau de boeuf pour la réaction de synthèse de glutamate sont comparables à ceux obtenus avec l'isoenzyme du foie par Frieden (55), et Engel (48), et reflètent une certaine similitude, déjà notée, des propriétés physico-chimiques de la protéine.

Le "turnover number" notamment, estimé par Frieden pour l'enzyme du foie à 56 s^{-1} , est proche de celui de la GDH du cerveau : 50 s^{-1} .

Une même similitude semble exister à propos des inhibitions par hautes concentrations de NADH et de 2-oxoglutarate ; ces effets seront décrits plus en détail dans un prochain chapitre (cf. 4.4).

Il faut encore relever la différence de vitesse maximum entre les deux sens de la réaction :

V (sens direct) : $1,34 \cdot 10^{-6} \text{Ms}^{-1}$; V (sens inverse) : $1,53 \cdot 10^{-7} \text{Ms}^{-1}$

Par contre, les constantes de Michaelis envers les deux coenzymes, forme oxydée et réduite, sont voisines :

$K_M \text{ NAD} : 2,42 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

$K_M \text{ NADH} : 3,63 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Atkinson (4) estimait que la stabilité du rapport NAD^+/NADH était due essentiellement à l'affinité des deux formes de coenzyme pour les sites ligands spécifiques. Il nous semble cependant que la GDH puisse participer à cette homéostasie par le biais de sa vitesse de catalyse, et éventuellement par l'action sur les constantes d'affinité des coenzymes, des modulateurs.

4.4. Inhibition de la réaction directe par excès de substrats

Lors des études cinétiques décrites plus haut, des phénomènes d'inhibition de la réaction enzymatique ont été observés à haute concentration en 2-oxoglutarate et en NADH.

Nous avons voulu, partant de quelques résultats expérimentaux, faire une rapide investigation du problème, qui pourrait se trouver lié à la régulation allostérique de la réaction.

4.4.1. Matériel, méthodes

Les conditions expérimentales sont celles du chapitre précédent, (cf. 4.3.2.) mais les concentrations de 2-oxoglutarate ont été élevées jusqu'à 20 mM, et celles de NADH jusqu'à 200 μM .

4.4.2. Résultats, discussion

La figure 4 montre l'effet d'inhibition de la réaction que provoque 2-oxoglutarate à des concentrations supérieures à 5 mM.

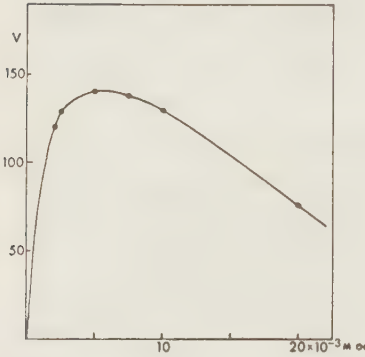


Figure 4. Inhibition de la réaction directe par excès de OG.
Diagramme de Michaelis.

Conditions expérimentales : NADH $5 \cdot 10^{-6}$ M
 NH_4^+ $2 \cdot 10^{-3}$ M dans du tampon Tris-HCl
0,2 M pH 7,5. GDH : 1,5 $\mu\text{g/ml}$.

La figure 5. illustre l'effet des ions ammonium sur l'action inhibitrice du 2-oxoglutarate, la concentration de NADH étant maintenue constante à un niveau non inhibiteur. Les diagrammes de second ordre semblent indiquer que cette inhibition soit non compétitive relativement à NH_4^+ .

Des graphes analogues sont obtenus lorsque NADH est substrat variable (à concentration non inhibitrice) pour différentes concentrations inhibitrice de 2-oxoglutarate. L'inhibition semble donc également de type non compétitif vis à vis de NADH.

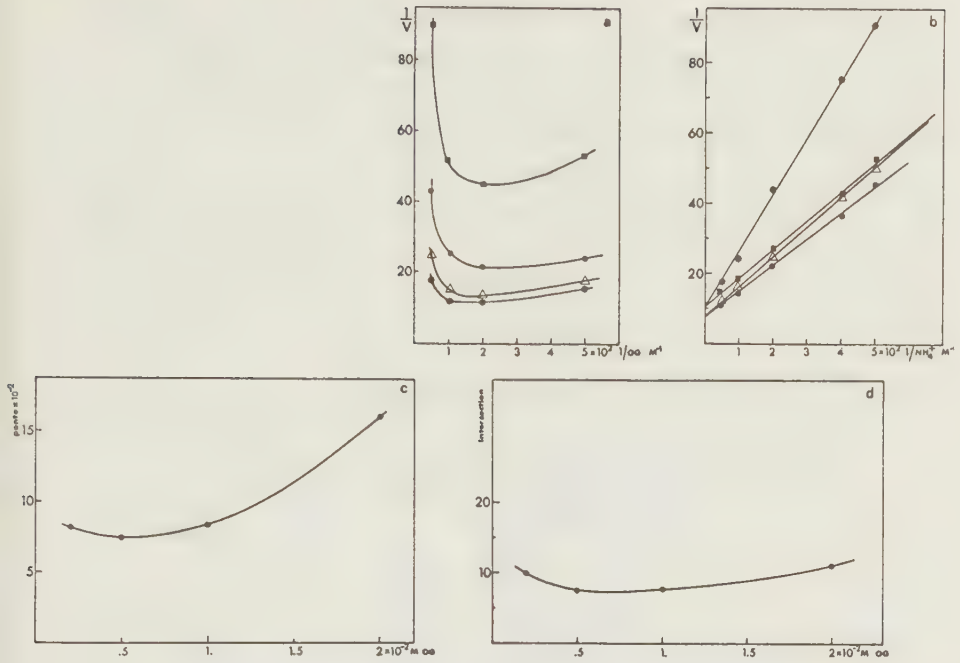


Figure 5 . Inhibition de la réaction directe par excès de 2-oxoglutarate : Effets des ions ammonium

Conditions expérimentales : NADH $1.5 \cdot 10^{-5}$ M GDH : 1,5 μ g/ml
dans tampon Tris-HCl 0,2 M pH 7,5.

(a) Diagramme de L-B. Concentration de NH_4^+ : (■) 2 (●) 5 (Δ) 10
(*) 20 mM.

(b) Diagramme de L-B. Concentration de OG : (■) 2 (●) 5 (Δ) 10
(*) 20 mM.

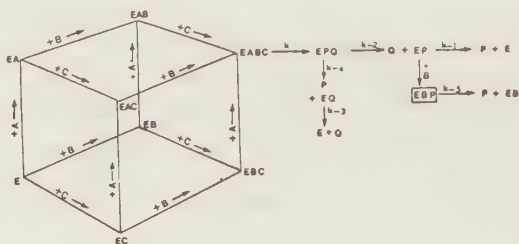
(c) Diagramme de second ordre. Pentas du diagramme b en fonction de OG

(d) Diagramme de second ordre. Intersections du diagramme b en fonction de OG.

La mise en évidence éventuelle d'un caractère parabolique de l'inhibition, du mécanisme et des constantes qui s'y rattachent nécessiterait un plus grand nombre de mesures et pourrait faire l'objet d'une étude ultérieure.

Une explication plausible semble cependant pouvoir être fournie par Silverstein & al (131) qui démontrent, à partir de mesures de vitesses d'échanges isotopiques à l'équilibre, qu'un complexe de type (GDH - NAD - 2-oxoglutarate) se forme à des concentrations saturantes en substrat.

Le système pourrait être schématisé comme suit :



k_{-5} étant plus petit que k_{-1} , k_{-2} et k , l'inhibition est effective si B est à une concentration suffisante.

L'inhibition par de hautes concentrations en coenzyme réduit est illustrée à la figure 6. On observe dans les diagrammes double-réciproque qu'elle se produit à des concentrations en NADH supérieures à $4 \cdot 10^{-5}$ M.

NADPH dans les mêmes conditions (figure 6.) ne provoque aucune inhibition.

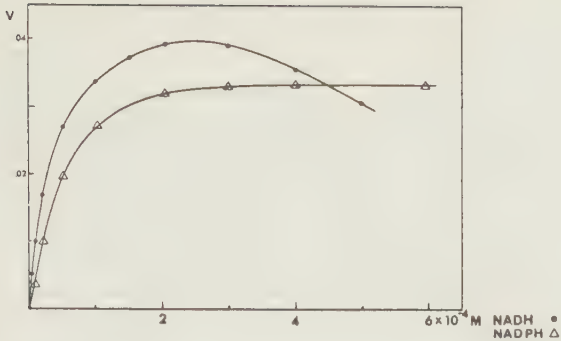


Figure 6. Diagramme de Michaelis de la réaction directe pour NADH et NADPH variables

Conditions expérimentales : OG $5 \cdot 10^{-3}$ M NH_4^+ $2 \cdot 10^{-2}$ M
Tampon Tris-HCl 0,2 M pH 7,5
GDH : 1,0 $\mu\text{g/ml}$

Ces résultats sont analogues à ceux obtenus cinétiquement par Frieden (56) pour la glutamate déshydrogénase du foie.

L'existence d'un second site de type régulateur, pour NADH, sur chacune des chaînes polypeptidiques, a été démontrée par différentes techniques (84) (99).

Bates & Frieden (6), par étude de la réaction complète (full-time course) au stopped-flow, ont démontré que NADH, fixé assez faiblement au site régulateur ($\text{E}-(\text{NADH})_2$), induit une isomérisation de la protéine qui l'inactive (effets coopératifs hétérotropiques). Ils concluent aussi que NADPH opère par une voie mécanistique simple, sans effets coopératifs.

Cet effet régulateur de NADH sera encore discuté à propos de l'allostérie.

4.5. Régulation allostérique de la glutamate déhydrogénase du cerveau

Plusieurs enzymes agissant au début de voies biosynthétiques, sont régulés par effet de "feedback" des produits ou par l'action d'autres agents régulateurs. La glutamate déhydrogénase est de cette sorte ; sa structure oligomérique permet des contrôles multiples de son activité catalytique, par l'action de substrats, de produits et de cofacteurs de plusieurs types (nucléotides, amino-acides et hormones notamment). Ces ligands induisent par transconformation et éventuellement par polymérisation réversible de la forme active, des interactions entre sites régulateurs et catalytiques des différentes chaînes polypeptidiques composant l'unité opérationnelle.

Ces effets se traduisent par des changements d'affinité des réactants pour les sites de la molécule d'enzyme, et cinétiquement par des inhibitions ou des activations qui sont de type allostérique.

Des modèles relatant ces phénomènes ont été proposés par Koshland & al (87) et par Monod & al (107).

La régulation allostérique de la glutamate déhydrogénase du neo-cortex cérébral a été en partie étudiée par Schwendimann (130) qui a notamment discuté les effets activateurs de 2'-3' AMP, 5'AMP et ceux, de type homotropique négatif, provoqués par NAD^+ sur la vitesse de désamination oxydative du glutamate.

Nous nous sommes intéressés, pour notre part, à plusieurs modulateurs possibles des réactions directes et inverses qui pourraient contrôler le niveau de certains métabolites importants dans le cerveau.

4.5.1. Modes d'investigation et d'interprétation

Les diagrammes dérivés de l'équation de Michaelis permettent une approche des phénomènes allostériques. D'autres types de relations seront en outre utilisés pour l'analyse, liées à l'équation de Hill.

Cette équation dérive d'un modèle d'Adair (1). Ce modèle mathématique permet de déterminer la fraction de sites occupés ($\bar{r}$) par un ligand (L) sur une protéine (P) à n sites de fixation pour L.

Si la protéine peut exister sous plusieurs formes de complexes intermédiaires

$$P_0 = P + PL + PL_2 + \dots + PL_{n-1} + PL_n$$

les constantes individuelles et successives de dissociation thermodynamique se définissent comme suit :

$$K_1 = \frac{(PL_{n-1})L}{PL_n} \quad K_2 = \frac{(PL_{n-2})L}{PL_{n-1}} \quad \dots \quad K_n = \frac{(P)L}{PL}$$

Le taux de saturation $\bar{r}$, défini par $\bar{v} = \frac{(L)_{lié}}{(P)_{tot.}}$ vaut :

$$\bar{v} = \frac{L/K_1 + 2 L^2/K_1 K_2 + \dots + n L^n/K_1 K_2 \dots K_n}{1 + L/K_1 + L^2/K_1 K_2 + \dots + L^n/K_1 K_2 \dots K_n}$$

Le modèle proposé par Hill (74) est une forme de l'équation de saturation, qui ne tient compte que d'une forme complexée PL_n . Cette équation n'est correcte théoriquement qu'à haute concentration en ligand, avec une coopérativité intersites maximale qui déplace l'équilibre vers le dernier terme (cas où PL_n prédomine).

$$\bar{v} = \frac{n L^n / K_n}{1 + L^n / K_n}$$

Par réarrangement, cette relation devient :

$$\bar{v} / n - \bar{v} = L^n / K_n$$

$$\bar{y} = \bar{v} / n \quad (\text{défini comme le taux moyen d'occupation par site})$$

$$\bar{y} / 1 - \bar{y} = L^n / K_n \quad \text{Equation de Hill}$$

n , appelé coefficient de Hill, va donner une indication sur la grandeur et le type de coopérativité observée (positive, négative).

L'équation de Hill, de forme exponentielle, se linéarise :

$$\log (\bar{y} / 1 - \bar{y}) = n \log L - \log K_n$$

Son utilisation en analyse cinétique est possible si l'on considère que le rapport ES_n/E_0 correspond, pour l'équation



donc $\bar{y} = v/V$. (Il faut ici postuler un équilibre rapide pour la formation du complexe.)

L'équation linéarisée devient donc

$$\log (v / V - v) = n_H \log S - \log K_H$$

n_H : coefficient de Hill K_H : constante de dissociation macroscopique pour S

4.5.2. Matériel, méthodes

Le détail des conditions expérimentales est donné au chap. 4.3.2.

Les coenzymes, cofacteurs (Merck) et substrats (Sigma) étaient tous de pureté analytique.

Les réactions étaient faites dans du tampon Tris-HCl 0,2 M à pH 7,5 et 8,5. Dans le sens direct, la concentration en GDH était de 1,5 $\mu\text{g/ml}$, sauf exception signalée ultérieurement. Dans le sens inverse, elle était de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Une expérience sur l'état de transition a été menée au moyen d'un appareil "stopped-flow" Aminco travaillant dans l'UV, équipé d'une lampe au deuterium, d'un photomètre lin-log et d'un monochromateur 0,25 m Ebert (Jarrell-Ash) à haute résolution. L'enregistrement était fait sur un oscilloscope Tektronix 5103N à image rémanente. Le chemin optique était de 1 cm et la lecture se faisait en transmission.

4.5.3. Résultats, discussion

4.5.3.1. Investigation sur une éventuelle coopérativité homotrope

Une coopérativité homotrope, du type de celle provoquée par NAD^+ dans la réaction inverse, a donc été supposée et testée.

Les diagrammes de Hill (figure 7) sont tracés pour chaque substrat en considérant comme vitesse réactionnelle, celle obtenue à une concentration infinie des deux autres substrats, ceci afin que tous les autres sites soient opérationnels.

Cela revient à prendre comme vitesse réactionnelle pour un substrat, la vitesse maximum apparente (V''), obtenue par

l'intersection des droites avec l'ordonnée des graphes de second ordre, eux-mêmes obtenus à partir d'intersections dans des graphes de premier ordre.

Les valeurs expérimentales utilisées sont exposées dans l'étude cinétique du Chap. 4.3. (les graphes de deuxième ordre y sont montrés, à l'exception de celui nécessaire pour tracer le diagramme de Hill pour NADH.) La vitesse maximum absolue, tiré du diagramme de troisième ordre vaut $1,34 \cdot 10^{-6} \text{ Ms}^{-1}$.

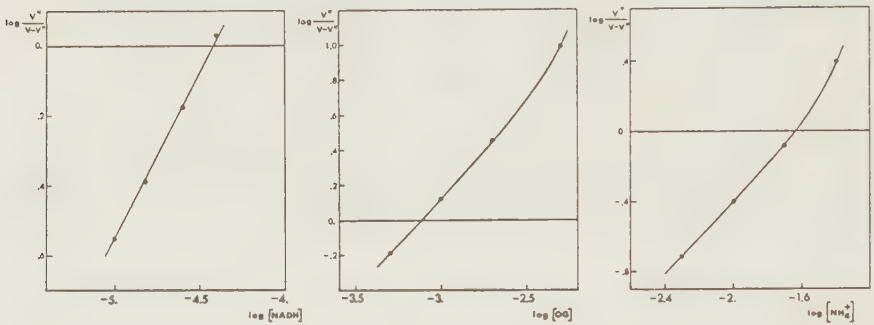


Figure 7. Diagrammes de Hill pour les trois substrats de la réaction directe
Conditions expérimentales : cf. chap. 4.3.

Table 4. Constantes de Hill

Substrats	K_H (M)	n_H
NADH	$3,70 \cdot 10^{-5}$	0,98
2-oxoglutarate	$7,58 \cdot 10^{-4}$	1,08
NH_4^+	$2,34 \cdot 10^{-2}$	1,01

La table 4 démontre qu'aucun effet de type coopératif homotrope ne semble influencer la réaction directe de synthèse de glutamate. Les sites catalytiques des différentes chaînes polypeptidiques paraissent travailler indépendamment les uns des autres.

4.5.3.2. Régulation par des adénosines phosphates

La table 5 récapitule les effets de divers nucléotides d'adénosine, cycliques ou non, sur les constantes cinétiques apparentes.

Table 5. Variation des constantes cinétiques apparentes par l'action des adénosines phosphates.

coenzymes	cofacteurs	$K_M \cdot 10^4 (M)$	$V \cdot 10^7 (M/s)$	n_H	$K_H \cdot 10^4 (M)$
NAD	—	2,00	5,36	0,98	2,18
	5'ADP	2,84	7,66	1,03	2,55
	5'AMP	3,70	12,76	0,95	3,72
	2'3'AMP _C	2,50	7,05	1,00	2,47
	3'5'AMP _C	3,13	9,57	0,94	3,50
NADH	—	0,72	2,06	1,00	0,74
	5'ADP	1,00	3,85	0,99	1,04
	5'AMP	1,00	3,84	0,96	1,18
	2'3'AMP _C	0,82	2,50	1,02	0,88
	3'5'AMP _C	0,91	3,15	0,95	1,00

Conditions expérimentales : Tampon Tris-HCl 0,2 M pH 8,5

Sens inverse : NAD $5 - 20 \cdot 10^{-5} M$ Glutamate $10^{-2} M$

Sens direct : NADH $5 - 40 \cdot 10^{-5} M$ 2-oxoglutarate $5 \cdot 10^{-3} M$
 NH_4^+ $10^{-2} M$

Modulateurs : $10^{-3} M$

Ces modulateurs n'ont que peu d'effets sur l'indice de coopérativité R_x mais ils affectent la constante d'affinité en même temps que la vitesse maximum apparente. La valeur absolue de ces effets semble différer selon le type de nucléotide, mais nous verrons plus loin que ces différences peuvent disparaître à d'autres concentrations du modulateur.

La diminution de l'affinité du coenzyme pour son site doit provoquer la modification de la vitesse de l'étape limitante de la réaction.

En figure 8 sont montrés les effets de concentrations en modulateur, sur la régulation des réactions directes et inverses

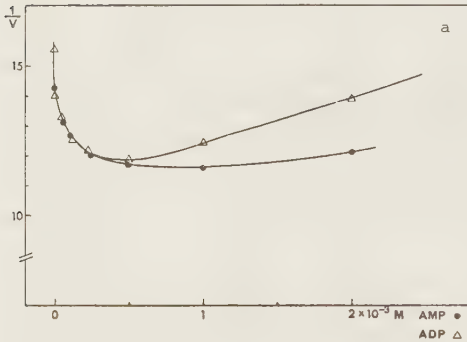


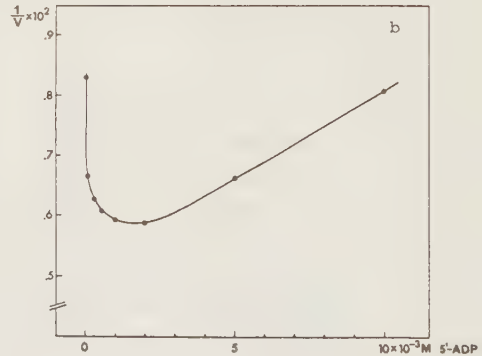
Figure 8. Diagramme de Dixon : Effets d'adénosines phosphate sur la réaction catalysée par la GDH

Conditions expérimentales :

Tampon Tris-HCl 0,2 M pH 8,5

(a) Réaction inverse
NAD 10^{-4} M Glu 10^{-2} M GDH 10 $\mu\text{g/ml}$

(b) Réaction directe
NADH $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ OG 10^{-2} M NH_4^+ $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
GDH 0,7 $\mu\text{g/ml}$



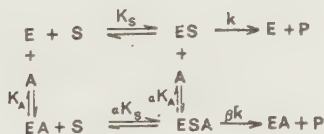
ADP et AMP aux concentrations inférieures à 200 μ M activent de façon identique la réaction inverse ; le premier cofacteur, cependant, devient plus rapidement inhibiteur, lorsque les concentrations sont augmentées. Ces inhibitions, qui se produisent aussi dans la réaction directe, doivent être dues à l'occupation, par ces modulateurs en excès, du site liant normalement les coenzymes.

Table 6. Constantes d'activation et d'inhibition liées à ADP et AMP

Modulateurs	Réaction directe		Réaction inverse	
	$K_A' \cdot 10^5(M)$	$K_A' \cdot 10^2(M)$	$K_A' \cdot 10^5(M)$	$K_A' \cdot 10^2(M)$
ADP	1,40	0,84	0,40	0,90
AMP	—	—	0,35	1,15

(Conditions expérimentales : cf. fig. 8.)

Le mécanisme réactionnel pourrait, dans les conditions où les cofacteurs sont activateurs, être défini comme suit, à partir de l'hypothèse des équilibres rapides :



A : activateurs α, β : facteurs de modification de constantes par activation
S : substrat

L'équation de vitesse correspondant à ce mécanisme est de la forme

$$v = k (ES) + \beta k (ESA)$$

$$v = \frac{V \frac{(S)}{K_S} + \beta V \frac{(A)(S)}{\alpha K_A K_S}}{1 + \frac{(S)}{K_S} + \frac{(A)}{K_A} + \frac{(A)(S)}{\alpha K_A K_S}}$$

S représentant dans cette étude le coenzyme (les autres substrats étant maintenus constants), cette équation, dans le sens direct de la réaction n'est valable que si sa concentration est inférieure à $\sim 40 \mu M$ (cas de l'expérience ci-dessus) ou à saturation avec NADPH.

Un mécanisme tenant compte simultanément de la compétition existant entre le second site (inhibiteur) à NADH et le site activateur à AMP d'une part, et de la compétition au niveau du site catalytique entre NADH et AMP en excès d'autre part, a déjà été proposé par Schwendimann (130).

Une mesure de la cinétique de formation du complexe (GDH - ADP) a été effectuée. (Fig. 9)

Basée sur l'observation, citée par Colen & al (24), d'un "red shift" du chromophore adénine lorsque le ligand se complexe, cette analyse au "stopped-flow" a permis de confirmer l'analogie de comportement des isoenzymes du foie et du cerveau face à ce type d'activateur.

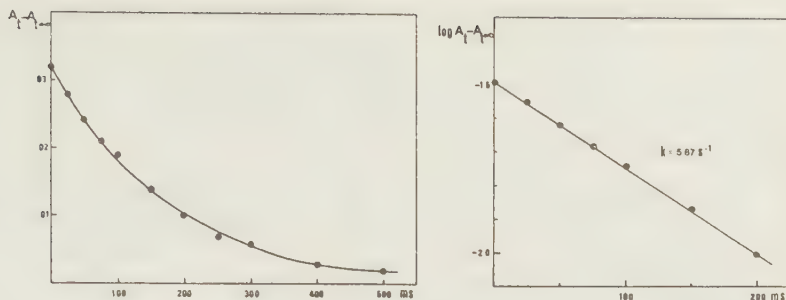


Figure 9. Cinétique de formation du complexe (GDH - ADP), mesurée à 253 nm au stopped-flow.

Conditions expérimentales : Tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7,5
 GDH : $3 \cdot 10^{-6}$ M ADP : $3 \cdot 10^{-5}$ M.

La réaction observée est d'ordre un apparent, sa demi-vie de 120 ms. Colen a démontré que cette vitesse correspond à une lente isomérisation du complexe ($EA \xrightleftharpoons[k'_{-A}]{k'_A} EA'$), qui succède à sa rapide formation ($E + A \xrightleftharpoons{K_A} EA$).

Il faut noter qu'une série d'expériences sur ce modèle pourrait être envisagée, permettant de démontrer la relation présumée (cf. chap. 5.), entre le site modulateur pour les adénosines phosphate et une cystéine particulière de la molécule, fortement réactive avec les dérivés organo-mercurés. La grande consommation d'enzyme faite au stopped-flow, est cependant un facteur limitant pour une telle étude.

L'effet de 5'ATP sur l'activité enzymatique est beaucoup plus compliqué. La figure 10 montre la nature parabolique de l'inhibition de la réaction inverse en fonction de NAD. Cleland (22) l'attribue à une combinaison, sur l'enzyme, de 2 molécules d'inhibiteur. Nous n'avons pas pu déterminer expérimentalement si l'inhibition est de type non compétitif ou de type mixte.

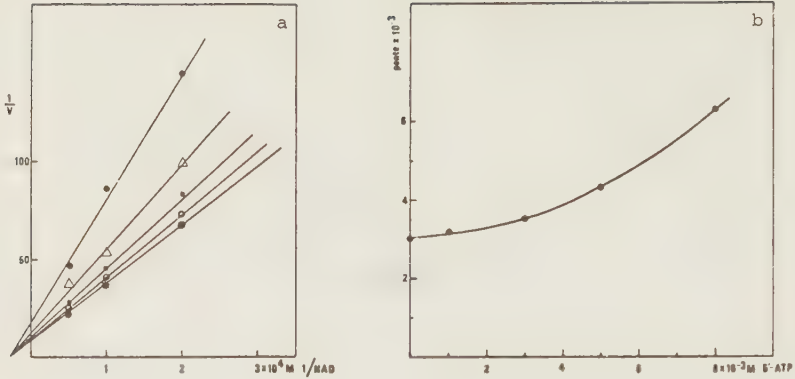


Figure 10. Effet de l'ATP sur la réaction inverse

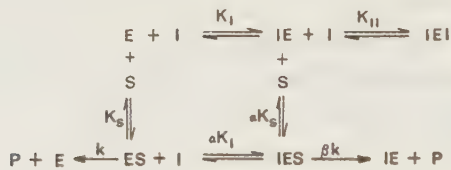
Tampon Tris-HCl 0,2 M pH 7,5 Glu 10^{-2} M

(a) Diagramme de L-B pour des concentrations en ATP de 0 (*) 1×10^{-3} (o) 3×10^{-3} (•) 5×10^{-3} (Δ) 8×10^{-3} (◊) 10^{-2} M

(b) Diagramme de second ordre en fonction des pentes

Nous pensons qu'une inhibition par l'ATP fixé au site du co-enzyme se juxtapose à l'inhibition due à la liaison de la molécule au site régulateur.

Le mécanisme, dans l'hypothèse d'un quasi équilibre des complexes, peut être schématisé comme suit :



L'équation de vitesse a la forme suivante :

$$v = k (ES) + \beta k (IES)$$

$$v = \frac{v \frac{(S)}{K_S} + \beta v \frac{(I)(S)}{\alpha K_I K_S}}{1 + \frac{(S)}{K_S} + \frac{(I)}{K_I} + \frac{(I)(S)}{\alpha K_I K_S} + \frac{(I)^2}{K_I K_{II}}}$$

La réciproque de cette expression, en fonction de (I), décrit une courbe voisine de celle de la figure 10 b.

L'effet de ATP 2 mM , à pH 7,5, sur la réaction directe, est illustrée par les diagrammes de Michaelis de la figure 11.

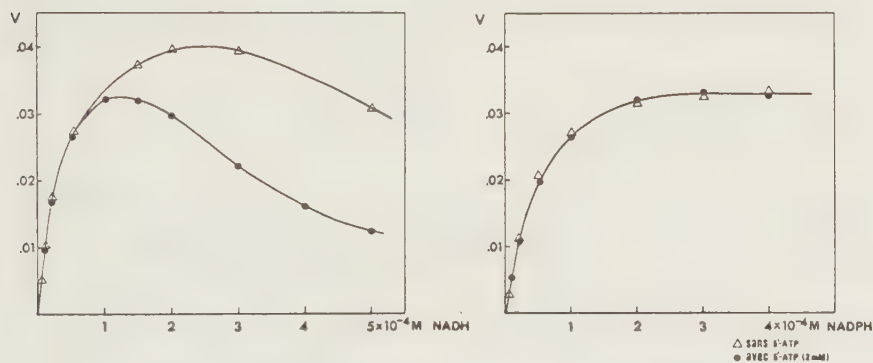


Figure 11. Modulation de la réaction directe par ATP (Diagrammes de Michaelis)

Conditions expérimentales : Tampon Tris-HCl 0,2 M pH 7,5
 OG : $5 \cdot 10^{-3}$ M NH_4^+ : $2 \cdot 10^{-2}$ M
 5'ATP : $2 \cdot 10^{-3}$ M

Il est possible d'observer à faible concentration en NADH, l'absence d'une modulation significative. Elle n'apparaît qu'au dessus de 50 μM en NADH, le cofacteur accentuant et coopérant à l'effet inhibiteur du coenzyme réduit.

Aucune modulation hétérotropique n'est par contre observée lorsque NADPH est coenzyme de la réaction.

L'interprétation de ces résultats est actuellement difficile. Certaines analogies entre l'action de GTP et celle de ATP existent.

Frieden (57) (58) a cherché les paramètres influençant la régulation de l'enzyme du foie par l'ATP. Le pH, la nature et la concentration des coenzymes lui paraissaient être en corrélation avec les activations ou les inhibitions qu'il observait.

La réciprocité de l'influence de tous les régulateurs doit sans doute être fondamentale pour le système lié à la GDH.

4.5.3.3. Régulation par GTP

L'effet de GTP sur la réaction d'oxydation du glutamate en présence d'enzyme du cerveau a déjà été discuté (130). Nous voulons simplement étudier son effet sur la réaction directe.

Des expériences préliminaires ont montré que GTP est un inhibiteur non compétitif envers le 2-oxoglutarate et de NH_4^+ .

L'inhibition est incompétitive vis à vis du coenzyme (fig. 12).

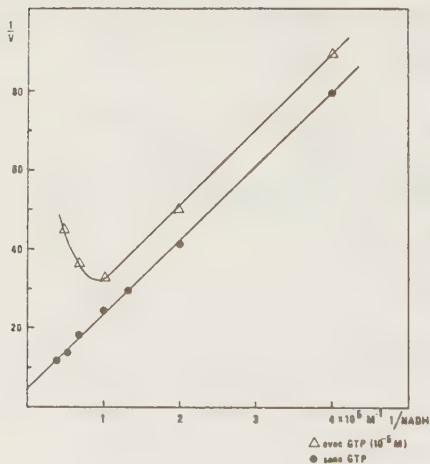


Figure 12. Effet de GTP sur la réaction directe. Diagramme de L-B.

Conditions expérimentales :

Tampon Tris-HCl 0,2 M pH 7,5

OG : 10^{-3} M NH_4^+ : 10^{-2} M

De plus, GTP peut provoquer une inhibition secondaire par augmentation de l'affinité de NADH pour son second site. Cet effet est tout à fait comparable à celui observé pour ATP.

La constante d'inhibition pour GTP a été déterminée dans les conditions décrites en figure 12, par une série de mesures à des concentrations non inhibitrices en coenzyme. Elle vaut :

$$K_I' = 1,1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

(Note : C'est à partir d'un diagramme analogue à celui de la fig. 12, pour des concentrations en NADH comprises entre 2 et 20 μM et en GTP comprises entre 0 et 10 μM qu'a été tracé un graphe de second ordre $1/V_i$ f (GTP) qui permet de tirer K_I' . En effet, partant de l'inverse de l'équation de vitesse pour un système d'inhibition incompétitive

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V} \frac{1}{S} + \frac{1}{V} \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)$$

on déduit :

$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{VK_I} I + \frac{1}{V}$$

4.5.3.4. Régulation par des amino-acides

Il a été démontré (89)(150) que certains acides aminés mono-carboxyliques modulent la réaction catalysée par l'enzyme du foie. Leurs effets sur la réaction utilisant la GDH du cerveau sont étudiés ici.

Leu, Ile et Val activent la réaction directe de façon incompétitive envers NADPH (fig. 13).

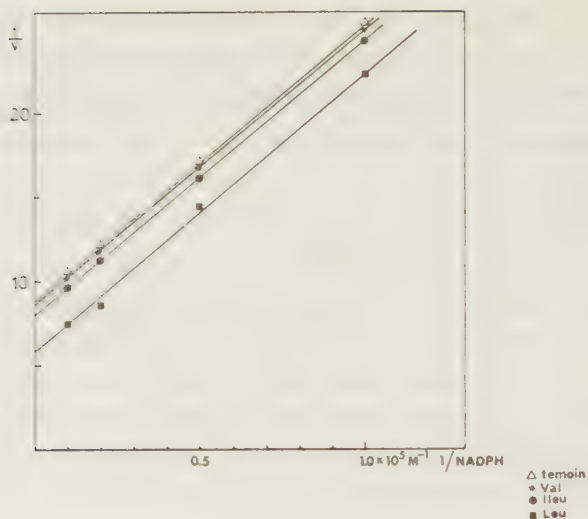


Figure 13. Régulation de la réaction directe par des acides aminés
Diagramme de L-B.

Conditions expérimentales : Tampon Tris-HCl 0,2 M pH 7,5

OG : $5 \cdot 10^{-3} M$ NH_4^+ : $10^{-2} M$ Modulateurs : $5 \cdot 10^{-3} M$

La table 7 montre leur influence sur les constantes cinétiques apparentes

Table 7. Effets de Leu, Ile et Val sur les constantes cinétiques de la réaction directe

Modulateurs	$K_M' \cdot 10^5 (M)_a$	$V' \cdot 10^7 (M/s)_a$	$K_A' \cdot 10^4 (M)_b$
-	1,87	3,05	-
Leu	2,86	4,62	4,60
Ile	2,06	3,35	4,58
Val	1,92	3,12	4,60

Conditions expérimentales : cf. fig. 13.

(a) Tirés de graphes $1/v$ f($1/NADPH$) $NADPH$: $2 - 20 \cdot 10^{-5} M$ aa. : $5 \cdot 10^{-3} M$

(b) Tirés de graphes $1/v$ f($1/aa$) aa. : $2 - 20 \cdot 10^{-3} M$ $NADPH$: $5 \cdot 10^{-5} M$

Aucune modulation de la réaction inverse n'est observée dans les conditions énoncées ci-après :

Tampon Tris-HCl 0,2 M pH 7,5 ; Glu 10^{-2} M ; NADP $1-4 \cdot 10^{-4}$ M
acides aminés : $2-20 \cdot 10^{-3}$ M.

Les acides aminés inversent l'effet inhibiteur produit par NADH en excès (fig. 14)

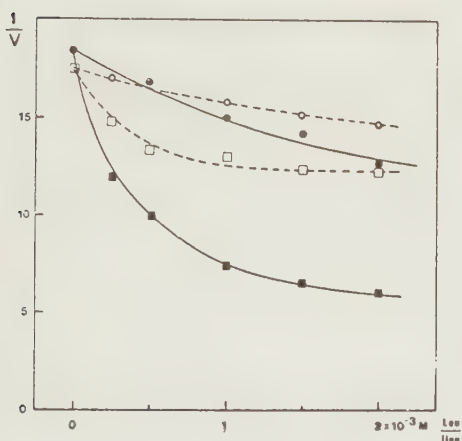


Figure 14. Effets de Leu et Ile sur l'inhibition par excès de NADH

Conditions expérimentales : Tampon Tris-HCl 0,2 M pH 8,0.

OG : $5 \cdot 10^{-2}$ M NH_4^+ : $1,2 \cdot 10^{-2}$ M

NADH	Leu	Ile
2×10^{-4} M	—●—	—○—
4×10^{-5} M	—■—	—□—

Ces résultats illustrent une relative analogie des effets régulateurs entre ces acides aminés et les adénosines phosphates.

Bien que les constantes d'activation des premiers soient au moins dix fois supérieures à celle des seconds, ils exercent la même influence sur la cohésion du complexe (coenzyme réduit - enzyme).

A ce propos, il faut relever le travail de Prough & al (117) (118) qui ont, par des études sur les complexes transitoires de l'enzyme du foie, montré les interférences qui existent entre le site fixant les acides aminés et le site spécifique du coenzyme réduit.

Ils ont, en plus, démontré que le site des amino-acides régulateurs pouvait être distingué de celui qui lie les nucléotides dérivés de l'adénine, mais qu'entre ces sites pouvaient exister des interactions réciproques à effets coopératifs positifs.

Nos résultats s'écartent de ceux de Kun & al (89) qui observaient, à pH 8,0, une activation de la réaction inverse par ces acides aminés. Leu et Val activaient de façon égale, en valeur absolue, la réaction directe.

L'impact de l'effet régulateur de Leu sur le métabolisme de l'azote a récemment été analysé par le groupe de Chappell (101) (102) (104).

Employant des mitochondries de foie de rat éclatées aux ultrasons, ils observaient une large activation de la réaction directe ($\sim 10 \cdot V$) et de la réaction inverse ($\sim 2 \cdot V$). Sur les mitochondries intactes, la même activation intervenait pour la réaction directe, tandis que la réaction inverse n'était pas modulée parce que, selon leurs hypothèses, la vitesse de transport du glutamate à travers les membranes mitochondriales devenait le facteur limitant.

Dans le foie, la leucine semble pénétrer rapidement et s'accumuler dans les mitochondries ; elle stimulerait alors une forte synthèse de glutamate (+ aspartate) à partir de NH_4^+ , au détriment de la synthèse de carbamoyl phosphate, donc de citrulline.

La conclusion de Chappell était que la concentration de Leu peut être déterminante pour la fixation du niveau des réserves de NH_4^+ . Il a par conséquent estimé que le système glutamate déhydrogénase n'est pas en équilibre dynamique, que l'enzyme ne joue qu'un rôle mineur dans le mécanisme de libération du ion ammonium.

Une telle interprétation peut probablement être transposable dans le cas du cerveau, à cause des analogies structurales et fonctionnelles constatées jusqu'ici entre les GDH de foie et de cerveau, à cause, aussi, de la barrière hémato-cérébrale qui amplifie la fonction biosynthétique dans le système nerveux central, malgré pourtant l'absence de cycle de l'urée dans ce tissu.

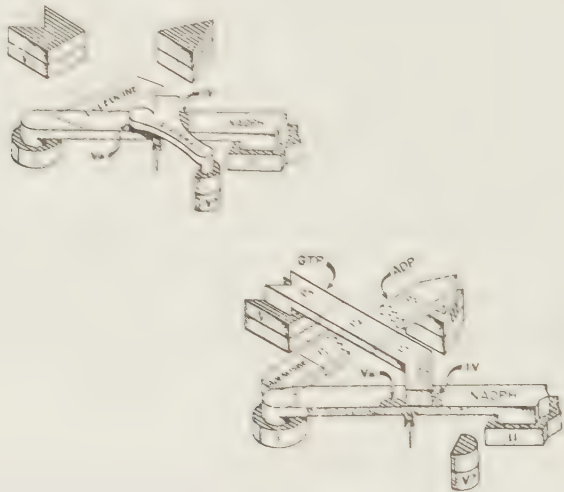
Il faut cependant souligner que, in vitro, l'activation est plus faible que celle constatée dans le système mitochondrial. Des enzymes comme la leucine transaminase (bien que Leu ne paraisse pas métabolisée) peuvent-ils venir compliquer l'analyse d'un tel système ?

4.5.4. Interprétation

Les modulateurs de la glutamate déhydrogénase semblent exercer leur action principalement sur l'affinité des coenzymes pour l'enzyme. L'existence de sites différents pour les adénosines phosphate, les guanosines phosphate, les amino-acides et éventuellement les stéroïdes régulateurs, leurs fonctions parfois

antagonistes, leurs interconnexions avec le site catalytique ont été discutés dans de nombreux articles, à partir de mesures cinétiques, de spectroscopie différentielle, de marquage spécifique de la protéine (135).

Fisher & al (33) (53) ont développé la thèse d'un mécanisme d'exclusion réciproque des différents ligands modulateurs allostériques ; un modèle topologique décrivant ces interactions, au moins partiellement, est reproduit ici.



Les effets des interactions entre sous-unités ne semblent pas encore élucidés.

Des phénomènes de polymérisation réversible de l'oligomère sont

en outre, liés à la régulation (135). GTP notamment, en présence de coenzyme, favorise l'aggrégation.

Nos résultats ont démontré l'analogie des systèmes régulateurs attachés aux GDH du foie et du cerveau, lorsque ces enzymes opèrent in vitro. Les mécanismes offerts par l'enzyme du foie supposent une modulation suffisamment souple pour satisfaire aussi aux conditions d'activité des mitochondries du cortex cérébral.

Il est possible d'imaginer l'extrême complexité, et peut-être l'extrême sensibilité (effets d'amplification notamment), de la régulation de ce système dans les mitochondries, du fait de la présence simultanée des coenzymes et des divers régulateurs aux effets agonistes ou antagonistes.

Cet important mécanisme modulateur qui dépend de l'état d' "energy charge" des groupes adénylates (défini par Atkinson (4)), d'un pool d'autres cofacteurs, d'effets "feedback", agit logiquement, sur un enzyme situé comme nous l'avons vu, au branchement d'une voie amphybolique et d'une voie biosynthétique.

Ce processus de contrôle semble fondamentalement important dans le cerveau où le flux de métabolites provenant du plasma sanguin est faible. La GDH va pouvoir stabiliser ou, au besoin corrigé, la concentration d'une série de composés au moyen de ce seul système de régulation allostérique.

5. INVESTIGATION SUR LA REACTIVITE D'UN GROUPE SULFHYDRILE
DE LA GLUTAMATE DEHYDROGENASE

Le rôle des groupements -SH dans la formation de complexes (GDH - ligands) n'est pas complètement élucidé. Cela est notamment dû au fait que des réactifs normalement spécifiques des Cys ne réagissent pas, se fixent préférentiellement sur d'autres amino-acides (37) (75) (76), ou encore provoquent des altérations hétérogènes des propriétés catalytiques (120).

Olson & al (112), Bitensky & al (10) puis Nishida & al (110) ont décrit quelques perturbations de la cinétique enzymatique (effets sur le site des adénosines phosphate en particulier) résultant de la modification des Cys par des dérivés organo-mercuriques.

Très récemment, Cosson & al (25) (26) (27) ont identifié la cystéine liant le p-hydroxy-mercuribenzoate (pMB) et ont émis l'hypothèse discutable d'une possible formation d'un complexe ternaire (enzyme - méthylmercure - pMB).

Une étude des relations entre cofacteurs et (enzyme - pMB) a été menée par "spin-labeling" (80)

Nous voulons décrire les premiers résultats obtenus sur le dérivé formé entre pMB et la GDH du cerveau en montrant les conséquences peu abordées jusqu'ici, sur l'activité enzymatique.

5.1. Matériel, méthodes

La glutamate déshydrogénase est traitée au charbon actif (Sigma) puis filtrée sur membrane Millipore (porosité 0,15 μ).

Les réactifs et les substrats sont de Sigma, les coenzymes de Merck, le chlorhydrate de guanidine de Schwarz-Mann. Tous ces produits sont de pureté analytique.

Le p-hydroxy-mercuribenzoate est recristallisé selon le procédé décrit par Boyer (12). Etant peu soluble au pH utilisé, il est dissous dans un minimum de NaOH 0,1 M, dilué dans le tampon et ultrafiltré. La concentration est déterminée spectrophotométriquement ($\epsilon_{233} = 16900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Les réactions sont faites dans du tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7,5 - glycérol 5 % et les mesures suivies à 250 nm par un spectrophotomètre Varian 635 à cellules thermostatées à 12 °C. Aucune dénaturation de l'enzyme n'est observée dans ces conditions.

La fixation de pMB sur l'enzyme est calculée à partir des perturbations de l'absorption spécifique du réactif.

$\Delta\epsilon_{250} = 7600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour la formation du mercaptide (12).

Les réactions avec le 5-5'dithiobis-2-nitrobenzoate (DTNB) sont faites dans les mêmes conditions, mais le changement de l'absorbance est mesuré à 412 nm ($\Delta\epsilon_{412} = 11400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (123)).

La réversibilité des réactions sont obtenue par adjonction d'un excès de 2-mercaptoéthanol ou de dithiothréitol (DTT).

Des mesures simultanées de l'activité enzymatique dans chaque sens réactionnel sont effectuées avec un second spectrophotomètre, dans le même tampon, en absence de glycérol.

5.2. Résultats

La figure 1 montre la réactivité de l'enzyme pour le pMB et l'effet de cette titration sur l'activité enzymatique.

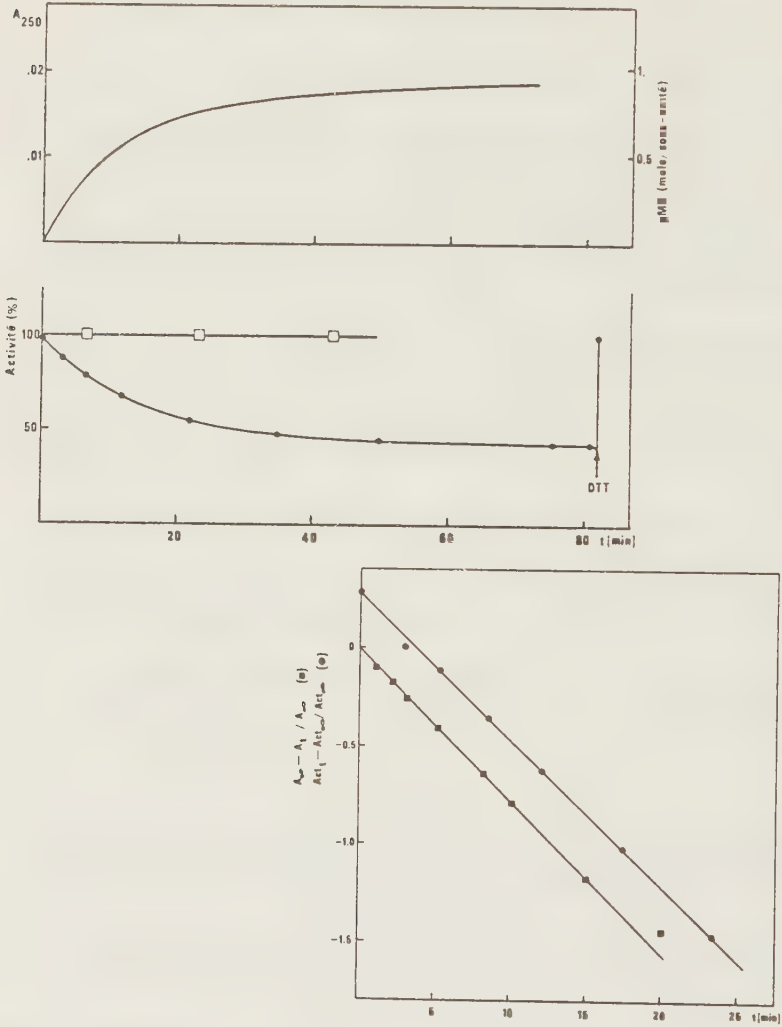


Figure 1. Réaction de la glutamate déhydrogénase du cerveau avec pMB.

Conditions expérimentales :

Tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7,5 - glycérol 5 % T : 12 °C

GDH : 0,16 mg/ml ($2,86 \cdot 10^{-6}$ M) pMB : $1,1 \cdot 10^{-4}$ M DTT : $2 \cdot 10^{-3}$ M

Activité enzymatique (ΔA_{340} /min) Tampon ci-dessus sans glycérol

Sens direct (□) : NADH : 10^{-4} M OG : 10^{-2} M NH_4^+ : 10^{-2} M
GDH : 20 μ l / 3 ml ($1,9 \cdot 10^{-8}$ M)

Sens inverse (•) : NAD : 10^{-4} M Glu : 10^{-2} M
GDH : 50 μ l / 3 ml ($4,8 \cdot 10^{-8}$ M)

Stoichiométriquement, une molécule de pMB est incorporée par sous-unité. La réaction, de pseudo premier ordre ($k' = 0,78 \text{ min}^{-1}$), reflète la faible réactivité de la cystéine impliquée.

Les cinq autres cystéines de la sous-unité sont inertes dans ces conditions.

L'inhibition de la réaction enzymatique d'oxydation du glutamate suit une cinétique parallèle à cette titration, mais l'amplitude de l'effet peut varier dans un intervalle de 60 à 80 %, en fin de titration. Cette inhibition est complètement abolie en présence de DTT (ou de 2-mercaptoéthanol) en excès, par déplacement probable de l'équilibre de la liaison en faveur du produit (pMB - DTT).

Aucune inhibition de la réaction directe de synthèse du glutamate n'est observée.

Dans les mêmes conditions expérimentales, le DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M), déjà utilisé pour le dosage des Cys de la protéine dénaturée par du chlorhydrate de guanidine 6M (cf.chap. 3.2.) ne réagit pas.

Dans le tampon Tris-HCl 0,2 M pH 7,5 , les deux réactifs provoquent une lente dénaturation irréversible de l'enzyme.

5.3. Discussion

La réactivité de la glutamate déshydrogénase du cerveau au pMB semble analogue à celle observée pour l'isoenzyme du foie (140). La faible vitesse de combinaison indique une faible réactivité de la cystéine touchée. Cette constatation est renforcée par l'observation d'une inertie de l'enzyme envers le DTNB notamment (réactif très spécifique des groupes -SH), ainsi que par la liaison préférentielle de l'acide iodoacétique à une Met plutôt qu'à un groupe thiol (146).

(Note : Gutfreund & al (67) qui ont comparé les réactivités de DTNB et pMB, ont relevé que, si la liaison S - Hg - C est linéaire, l'angle diédrique de la liaison S - C obtenu avec le réactif alkylant est de 90° , d'où un éventuel empêchement stérique.)

La réponse contrastée de l'enzyme en solution dans du tampon Tris-HCl ou phosphate, reflète probablement l'existence d'états de conformation différents de la protéine. La GDH semble stabilisée par les ions phosphates.

L'action inhibitrice de pMB était signalée par Olson & al (112) pour l'enzyme du foie, mais Bitensky & al (10) ne l'observaient pas. Les quelques commentaires tirés des publications récentes du groupe de Pantaloni (25-27) suggèrent que l'activité enzymatique ne serait pas modifiée lors d'une telle titration.

Des études préalables faites avec de la GDH de foie (Boehringer) traitée au charbon actif, puis combinée au pMB, nous ont permis la mise en évidence de phénomènes d'inhibition tout à fait analogues à ceux observés avec la GDH du cerveau. Ces variantes de l'activité enzymatique sont actuellement inexplicables.

La stabilité de la réaction enzymatique dans le sens direct, parallèlement à la désactivation en réaction inverse, semblent indiquer que pMB n'induit pas une transconformation de l'oligomère lors de sa fixation. Il nous paraît plus facile d'imaginer que pMB agisse sur la vitesse limitante de libération du NAD(P)H, par modification de l'environnement du site du co-enzyme réduit.

Il faut relever à ce propos un certain mimétisme des influences de pMB et d'ATP sur l'activité enzymatique, consécutif à leur fixation sur l'enzyme ; ils paraissent inhiber avant tout la réaction d'oxydation du glutamate. Ces constatations pourraient étayer les thèses de Nishida & Yielding (110) qui ont constaté une diminution des effets régulateurs de l'ADP lorsque l'enzyme était substitué avec du méthylmercure.

Des mesures cinétiques préliminaires sur la réaction en sens direct, effectuées avec le complexe pMB - GDH de foie, nous ont, en plus, montré que le pMB retarde fortement l'effet inhibiteur de NADH en excès ; ADP devient inhibiteur alors que GTP perd une partie de son effet inhibiteur.

Pour mieux saisir les conséquences de ce marquage sélectif sur la liaison de cofacteurs et de substrats, à savoir le rôle éventuel du groupe sulfhydrile réactif, une série d'expériences en spectroscopie différentielle notamment peut être envisagée avec le complexe (GDH - pMB). Des résultats pourraient également être obtenus par des mesures en stopped-flow, du type de celles décrites précédemment (cf. chap. 4.5.3.2.), ou par des mesures suivies par CD, de modifications du spectre du coenzyme réduit, induites par des cofacteurs et déjà observées sur l'enzyme natif (85).

Il faut, en terminant, signaler à propos du diagramme semi-logarithmique de la figure 1, que les droites obtenues présentaient presque toujours, lorsqu'elles étaient prolongées, une rupture qui reflète un changement de phase de la réaction. Les amplitudes des phases lentes et des phases rapides correspondaient approximativement à la moitié des effets d'inhibition et théoriquement à trois cystéines titrées par molécule d'enzyme. Cette cinétique biphasique pourrait résulter d'une hétérogénéité des six sous-unités polypeptidiques, suggérant l'idée que chaque oligomère réagirait au PMB comme deux trimères.

Il n'est pas exclu, cependant, que cette rupture de linéarité puisse procéder d'une certaine imprécision dans l'estimation des "end-points" (A_{∞} , Act_{∞}), due à la faible amplitude des signaux étudiés. D'autres expériences seraient nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

6. CONCLUSION

Nous nous étions proposés de poursuivre l'étude préalablement entreprise par Schwendimann (130) sur les propriétés moléculaires et catalytiques de la glutamate déhydrogénase du système nerveux central chez le boeuf. Il nous semblait nécessaire d'augmenter le nombre des données concernant l'enzyme isolé, données absolument indispensables à l'analyse du système métabolique qui l'implique.

La protéine s'est révélée très homogène. Sa structure ressemble à celle de son isologue du foie. En particulier, sa masse moléculaire, sa conformation, sa capacité à polymériser sont analogues. De légères différences sont observées, dans la composition en acides aminés, les points isoélectriques, certains déterminants antigéniques, qui obligent à la définir comme un isoenzyme de la protéine du foie.

Son impact présumé sur le métabolisme cérébral nous a conduit à étudier de façon approfondie la cinétique de la réaction de synthèse du glutamate, la spécificité de l'enzyme au pH physiologique et son potentiel modulateur.

Les constantes catalytiques obtenues, et en particulier le "turnover" de l'enzyme du cerveau, ne semblent pas fondamentalement différents de ce qui a été observé avec la GDH de foie. Nous avons, entre autre, confirmé l'hypothèse d'un mécanisme cinétique de type aléatoire dans l'étape de formation des complexes transitoires.

La spécificité de l'enzyme s'est révélée très stricte à pH 7,5 envers le glutamate et le 2-oxoglutarate.

La régulation, de type allostérique, liée à l'action des substrats, des produits, des coenzymes et des cofacteurs, semble d'une souplesse infinie et doit pouvoir permettre un contrôle très ajusté des systèmes métaboliques dépendants de la GDH.

Seules, des données plus précises sur les concentrations et les flux des métabolites, permettraient de savoir si le système lié à la GDH est en quasi-équilibre permanent. Il est pourtant probable que, dans le cerveau, l'enzyme soit accaparé par la synthèse, modulée allostériquement, du glutamate.

Des recherches sur la glutamate déhydrogénase du système nerveux central pourraient être encore envisagées. Il serait surtout utile de déterminer, au niveau des synaptosomes ainsi que dans les zones non-synaptiques, les concentrations relatives de tous les enzymes reliés métaboliquement, dans la matrix mitochondriale, à la GDH. Cette stoechiométrie des enzymes, associée à celle des réactants, permettrait de mieux définir l'importance relative de chaque voie métabolique que contrôle la GDH.

Diverses études cinétiques pourraient également être entreprises, à partir de pools d'enzymes comprenant la GDH et l'un ou l'autre des enzymes interagissant avec elle, dans les mitochondries des synaptosomes du cerveau, ceci afin de reproduire plus fidèlement le système in vivo. (Une analyse de ce type a été décrite récemment par Fahien & al (50).)

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Adair G.S. J.Biol.Chem. 63 529 (1925)
- (2) Adler A.J. & Fasman G.D. Methods in Enzymology 12 Colowick S. & Kaplan N. ed. Acad.Press N-Y. (1963) pp 268-302
- (3) Appella E. & Tomkins G.M. J.Mol.Biol. 18 77 (1966)
- (4) Atkinson D.E. The Enzymes 1 Boyer P.D ed. Acad.Press N-Y. (1970) pp 461-489
- (5) Barrat R.W. & Strickland W.N. Arch.Biochem.Biophys. 102 66 (1963)
- (6) Bates D.J. & Frieden C. J.Biol.Chem. 7885-7890 (1973)
- (7) Beloff-Chain A., Cantanzaro R., Cham E.B., Masi I. & Pocchiari F. Proc.Roy.Soc.B. 144 22-28 (1955)
- (8) Bender R.A., Macoluso A. & Magasanik B. J.Bact. 127 141-148 (1976)
- (9) Berl S. & Frigyesi T.L. Brain Res.14 683-695 (1969)
- (10) Bitensky M.W., Yielding K.L. & Tomkins G.M. J.Biol.Chem. 240 668-673 (1965)
- (11) Blumenthal K.M. & Smith E.L. Biochem.Biophys.Res.Comm. 62 78-84 (1975)
- (12) Boyer P.D. J.Am.Chem.Soc. 76 4331-4337 (1954)
- (13) Bradford H.F. & Ward H.K. Biochem.Soc.Trans. 3 1223-1226 (1975)
- (14) Brigg G.E. & Haldane J.B.S. Biochem.J. 19 338 (1925)
- (15) Burton K. & Krebs H.A. Biochem.J. 54 94-107 (1953)
- (16) Cassman M. & Schachman H.K. Biochem. 10 1015-1024 (1971)

- (17) Caughey W.S., Smiley J.D. & Hellerman L. J.Biol.Chem. 224 591 (1957)
- (18) Cha S. J.Biol.Chem. 243 820-825 (1968)
- (19) Chappell J.B. Brit.Med.Bull. 24 150-157 (1968)
- (20) Chen Y-H., Yang J.T. & Chan K.H. Biochem. 13 3350-3359 (1974)
- (21) Cleland W.W. Biochem.Biophys.Acta 67 104, 173, 188 (1963)
- (22) Cleland W.W. The Enzyme 2 Boyer P.D. ed. Acad.Press (1970) pp 1-65
- (23) Cohn E.J. & Edsall T.J. Proteins, Amino-Acids and Peptides Reinhold Publishing N-Y. (1943)
- (24) Colen A.H., Cross D.G. & Fisher H.F. Biochem. 13 2341-2347 (1974)
- (25) Cosson M.P., Gros G. & Talbot J.C. Biochem.Biophys.Res.Comm. 72 1304-1310 (1976)
- (26) Cosson M.P. & Pantaloni D. Eur.J.Biochem. 69 571-576 (1976)
- (27) Cosson M.P. & Pantaloni D. Arch.Biochem.Biophys. 180 49-56 (1977)
- (28) Craven D.B. Harvey M.J., Lowe C.R. & Dean P.D.G. Eur.J. Biochem. 41 329-333 (1974)
- (29) Crestfield A.M., Moore S. & Stein W.H. J.Biol.Chem. 238 622-627 (1963)
- (30) Crompton M. & Chappell J.B. Biochem.J. 132 35-46 (1973)
- (31) Cross D.G. J.Biol.Chem. 247 784-789 (1972)
- (32) Cross D.G., McGregor L.L. & Fisher H.F. Biochem.Biophys. Acta 289 28 (1972)
- (33) Cross D.G. & Fisher H.F. J.Biol.Chem. 245 2612 (1970)
- (34) Dalziel K. Biochem.J. 80 440 (1961)
- (35) Dalziel K. Acta Chem.Scand. 11 1706-1723 (1957)

- (36) Dalziel K. Biochem.J. 114 547-556 (1969)
- (37) David M., Rashed I.R. & Sund H. Eur.J.Biochem. 74 379-385 (1977)
- (38) Davidson N. Neurotransmitter Amino-Acids Acad.Press N.Y. (1976)
- (39) Davis B.J. Ann.N.Y.Acad.Sci. 121 404-427 (1964)
- (40) Dessen P. & Pantaloni D. Eur.J.Biochem. 8 292-302 (1969)
- (41) DeTar D.F. Computer Programms for Chemistry Acad.Press N.Y. (1972)
- (42) Edelstein S.J. & Schachman H.K. J.Biol.Chem. 242 306-311 (1967)
- (43) Egan R.R. & Dalziel K. Biochem.Biophys.Acta 250 47-50 (1971)
- (44) Eisenberg H. & Tomkins G.M. J.Mol.Biol. 31 37 (1968)
- (45) Eisenberg H., Josephs R. & Reisler E. Advances in Protein Chemistry 30 (1976) pp 101-181 Acad.Press N.Y.
- (46) Ellman G.L. Arch.Biochem.Biophys. 82 70 (1952)
- (47) Engel P.C. & Dalziel K. Biochem.J. 105 691-695 (1967)
- (48) Engel P.C. & Dalziel K. Biochem.J. 118 409-419 (1970)
- (49) Engel P.C. & Chen S.S. Biochem.J. 151 305-318 (1975)
- (50) Fahien L.A., Hsu S.L. & Kmietek E. J.Biol.Chem. 252 1250-1256 (1977)
- (51) Fine I.H. & Costello L.A. Methods in Enzymology 6 Colowick S. & Kaplan N. ed. Acad.Press (1963) pp 958-972
- (52) Fisher H.F. The Mechanism of Action of Dehydrogenases Schwert C.W. & Winer A.D. ed. The Univ. Press Kentucky, Lexington (1969) p 221
- (53) Fisher H.F., Gates R.E. & Cross D.G. Nature 228 247 (1970)
- (54) di Franco A. & Iwatsubo M. Biochimie 53 153-159 (1971)

- (55) Frieden C. J.Biol.Chem. 234 2891-2896 (1963)
- (56) Frieden C. J.Biol.Chem. 234 809-814 (1963)
- (57) Frieden C. J.Biol.Chem. 234 815-820 (1963)
- (58) Frieden C. Role of Nucleotides for the Function and Conformation of Enzymes Kalckar H. ed. Munksgaard, Copenhagen (1969) pp 194-217
- (59) Fugita H. Mathematical Theory of Sedimentation Analysis Acad.Press, N.Y. (1962)
- (60) Gibson G. & Blass J.P. J.Biol.Chem. 251 4127-4130 (1976)
- (61) Godinot C. Julliard J.H & Gautheron D.C. Anal.Biochem. 61 264-270 (1974)
- (62) Greenfield N.J., Davidson B. & Fasman G.D. Biochem.8 1630 (1967)
- (63) Gross M., Cooper A.J.L. & Meister A. Biochem.Biophys.Res. Comm. 70 373-380 (1976)
- (64) Guilford H.A., Larsson P.O. & Mosbach K. Chemica Scripta 2 165-170 (1972)
- (65) Gürther L.G. J. of Chromatog. 76 255 (1973)
- (66) Gutfreund H. & McMurray C.M. Chemical Reactivity and Biological Role of Functional Groups in Enzymes, Smellie R.M.S. ed. Acad.Press N.Y. (1970) pp 39-47
- (67) Gutfreund H. & McMurray C.M. Symp.Biochem.Soc. 31 39-47 (1971)
- (68) Haldane J.B.S. Enzymes, Longmans ed Green and Co Ltd Londc (1930)
- (69) Harvey M.J., Lowe C.R., Craven D.B. & Dean P.D.G. Eur.J.Biochem. 41 335-340 (1974)
- (70) Harvey M.J., Lowe C.R. & Dean P.D.G. Eur.J.Biochem. 41 353-357 (1974)

- (71) Hauert J. Thèse de doctorat, Ecole de Chimie Univ. de Genève (1977)
- (72) Hawkins R.A., Miller A.L., Nielsen R.C. & Veech R.L. Biochem.J. 134 1001-1008 (1973)
- (73) Henri V. Acad.Sci. Paris 135 916 (1902)
- (74) Hill A.V. J.Physiol. London 40 190 (1910)
- (75) Holbrook J.J., Roberts P.A. & Wallis R.B. Biochem.J. 133 165-171 (1973)
- (76) Holbrook J.J. & Jeckel R. Biochem.J. 111 689-694 (1969)
- (77) Horecker B.L. & Kornberg A. J.Biol.Chem. 175 385 (1948)
- (78) Hochreiter M.C., Patek D.R. & Schellenberg K.A. J.Biol.Chem. 247 6271-6276 (1972)
- (79) Hochreiter M.C. & Schellenberg K.A. J.Amer.Chem.Soc. 9 6530 (1969)
- (80) Jallon J-M., di Franco A., Leterrier F. & Piette L Biochem.Biophys.Res.Comm. 74 1186-1191 (1977)
- (81) Josephs R. J.Mol.Biol. 97 127-130 (1975)
- (82) Jouannot M. Toxicon 5 191-199 (1968)
- (83) King E.L. & Altman C. J.Phys.Chem. 60 1375 (1956)
- (84) Koberstein R. & Sund H. Fed.Eur.Biochem.Soc.Lett. 19 149-151 (1971)
- (85) Koberstein R. & Sund H. Eur.J.Biochem. 36 545-552 (1973)
- (86) Kopitz R.W. 9830 Math.Pac. (Hewlett-Packard 09830-7000)
- (87) Koshland D.E., Nemethy G. & Filmer D. Biochem. 5 365 (1966)
- (88) Kratky O., Leopold H & Stabinger H. Methods in Enzymology 27 Colowick S. & Kaplan N. ed. Acad.Press N.Y. (1973)
- (89) Kun E. & Achmatowicz B. J.Biol.Chem 240 2619-2627 (1965)

- (90) Lai J.C.K. & Clark J.B. Biochem.J. 154 423-432 (1976)
- (91) Landon M., Melamed M.D. & Smith E.L. J.Biol.Chem. 246 2360-2373 (1971)
- (92) Layne E. Methods in Enzymology 3 Colowick S. & Kaplan N ed. Acad.Press N.Y. (1957) pp 447-454
- (93) Lewin F. Displacement of Water and its Control of Biochemical Reactions Acad.Press N.Y. (1974) pp 285-314
- (94) Lin T.Y. & Chang Y.H. J.Biol.Chem. 246 2842-2848 (1971)
- (95) Lineweaver H. & Burk D.J. J.Amer.Chem.Soc 56 658 (1934)
- (96) Lowe C.R., Mosbach K. & Dean P.D.G. Biochem.Biophys.Res.Comm. 48 1004-1010 (1972)
- (97) Lowry O.H., Rosebroug N.J., Farr A.L. & Randall R.J. J.Biol.Chem. 193 265-275 (1951)
- (98) Malcolm A.D.B. Hoppe-Seiler's Physiol.Chem.352 883-884 (1971)
- (99) Malenick D.A. & Anderson S.R. Biochem. 11 2766-2771 (1972)
- (100) Marler E. & Tanford J.Biol.Chem. 239 4217-4218 (1964)
- (101) McGivan J.D., Bradford N.M., Crompton M. & Chappell J.B. Biochem.J. 134 209-215 (1973)
- (102) McGivan J.D. & Chappell J.B. FEBS Letter 52 1-7 (1975)
- (103) McIlwain H. Biochemistry and the Central Nervous System, Churchill, third edition (1966)
- (104) Mendes-Mourão J., McGivan J.D. & Chappell J.B. Biochem.J. 146 457-464 (1975)
- (105) Michaelis L. & Menten M.L. Biochem.Z. 49 333 (1913)
- (106) Miller A.L., Hawkins R.A. & Veech R.L. J.Neurochem. 20 1393-1400 (1973)
- (107) Monod J., Wyman J. & Changeux J-P. J.Mol.Biol. 12 88 (1965)

- (108) Moon K. & Smith E.L. J.Biol.Chem. 248 3082-3088 (1973)
- (109) Moore S. & Stein W.H. Methods in Enzymology 6 Colowick S. Kaplan N.O. ed. Acad.Press N.Y. (1963) pp 819-831
- (110) Nishida M. & Yieliding K.L. Arch.Biochem.Biophys. 141 409-415 (1970)
- (111) Olson J.A. & Anfinsen C.B. J.Biol.Chem. 197 67-79 (1952)
- (112) Olson J.A. & Anfinsen C.B. J.Biol.Chem. 202 841-856 (1953)
- (113) Ornstein L. Ann.N.Y.Acad.Sci. 121 321-349 (1964)
- (114) Ouchterlony O. Diffusion in Gel Method for Immunological Analysis II Progr.Allergy 6 30-154 (1962)
- (115) Ouchterlony O. & Nilson L.A. Handbook of Experimental Immunology Weir D.M ed, 2^e ed. Blackwell Scientific Publication Oxford (1973)
- (116) di Prisco G. & Strecker H.J. Eur.J.Bioche. 9 507-511 (1969)
- (117) Prough R.A. & Fisher H.F. Biochem. 11 2479-2482 (1972)
- (118) Prough R.A., Culver J.M. & Fisher H.F. J.Biol.Chem. 248 8528-8533 (1973)
- (119) Rabyt J.F., Ackerman R.J. & Chittenden C.G. Arch.Biochem. Biophys. 147 262-269 (1971)
- (120) Rashed I, Bohn A., David M. & Sund H. Biochem.Soc.Trans. 3 926-927 (1975)
- (121) Reisler E.A. Poujet J & Eisenberg H. Biochem. 9 3095-3102 (1970)
- (122) Roberts R.B, Flexner J.B. & Flexner L.B. J.Neurochem. 4 78-90 (1959)
- (123) Rabyt J.F., Ackerman R.J. & Chittenden C.G Arch.Biochem. Biophys. 147 262-269 (1971)
- (124) Rosenheck K. & Doty P. Proc.Nat.Acad.Sci. 47 1775 (1961)

- (125) St Omer J. Neurochem. 18 365-374 (1971)
- (126) Schachman H.K. Methods in Enzymology 4 Colowick S. & Kaplan N. ed. Acad. Press N.Y. (1957) p 70
- (127) Schachman H.K. & Edelstein S.J. Biochem. 5 2681-2705 (1966)
- (128) Scheidegger J.J. Int. Arch. Allergy 7 103-110 (1955)
- (129) Schwendimann B., Pfister J. & Bargetzi J-P. Expériencia 28 740 (1972)
- (130) Schwendimann B. Thèse de doctorat, Ecole de chimie Univ. de Genève (N° 1639) Genève
- (131) Siverstein E. & Sulebele G. Biochem. 12 2164-2172 (1973)
- (132) Simmons N.S & Blout E.R. Biophys. J. 1 55 (1960)
- (133) Simpson D.P. & Adam W. J. Biol. Chem. 250 8148-8158 (1975)
- (134) Sjöholm I. & Ekman B. Anal. Biochem. 65 596-599 (1975)
- (135) Smith E.L., Austen B.M., Blumenthal K.M. & Nyc J.F. The Enzymes, third edition 11 Boyer P.D. ed. Acad. Press (1975) pp 293-367
- (136) Spackman K., Stein W.H. & Moore S. Anal. Chem. 30 1191 (1958)
- (137) Stadtman E.R. Advan. Enzymol. 28 51 (1966)
- (138) Struck J. & Sizer I.W. Arch. Biochem. Biophys. 86 260 (1960)
- (139) Sund H. Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenase Springer Verlag Berlin (1970) p 267
- (140) Sund H. & Akeson A. Biochem. Z. 340 421 (1964)
- (141) Svedberg T. & Pedersen K.V. The Ultracentrifuge, Oxford Univ. Press, London & N.Y. (1940)
- (142) Talal N., Tomkins G.M., Mushinski J.F. & Yielding K.L. J. Mol. Biol. 8 46-53 (1964)
- (143) Tempest P.W., Meers J.L. & Brown E.M. Biochem. J. 117 405-407 (1970)

- (144) Tomkins G.M., Yielding K.L., Talal N. & Curvan J.F.
Cold Spring Harbor Sym.Quant.Biol. 28 461-470 (1963)
- (145) Watkins J.C. Biochem.Soc.Symp. 36 33-47 (1972)
- (146) Wells B.D. J.Mol.Biol. 97 391-394 (1975)
- (147) Wetlaufer D.B. Adv.Prot.Chem. 17 303 (1962)
- (148) Williams J.W., von Holde K.E., Baldwin R.L. & Fujita H.
Chem.Rev. 58 715 (1958)
- (149) Williamson D.H., Lund P. & Krebs H.A. Biochem.J. 103
514-527 (1967)
- (150) Yielding K.L. & Tomkins G.M Proc.Nat.Acad.Sci. 47
983-989 (1969)
- (151) Yphantis Biochem 3 297-317 (1964)

